

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-519472

(P2003-519472A)

(43) 公表日 平成15年6月24日 (2003.6.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/395	D 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/46			N 4 B 0 2 4
39/395		48/00	4 B 0 5 0
		A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 3
48/00		25/00	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-538481 (P2001-538481)	(71) 出願人	ファルマシア・イタリア・エッセ・ピー・ アー
(86) (22) 出願日	平成12年11月14日 (2000.11.14)		イタリア国、20152・ミラン、ピア・ロベ ルト・コツク、1. 2.
(85) 翻訳文提出日	平成14年5月14日 (2002.5.14)	(72) 発明者	ダールベルグ、マツ
(86) 国際出願番号	P C T / E P 0 0 / 1 0 7 3 6		スウェーデン国、エス-114 20・ストツ クホルム、ピツガー・ジアルスガタン・ 112
(87) 国際公開番号	W O 0 1 / 0 3 6 6 0 2	(72) 発明者	モル、ユルゲン
(87) 国際公開日	平成13年5月25日 (2001.5.25)		イタリア国、イ-22070・アブビアーノ・ ジエンティレ、ロカリタ・サン・パートロ メオ
(31) 優先権主張番号	0 9 / 4 3 9 , 7 5 6	(74) 代理人	弁理士 川口 義雄 (外4名)
(32) 優先日	平成11年11月15日 (1999.11.15)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

(54) 【発明の名称】 P21活性化キナーゼ (PAK) タンパク質ファミリーの一つであるPAK5、これに関する核酸および方法

(57) 【要約】

本発明は、PAK5セリン/トレオニンキナーゼを同定しコードするp a k 5ポリヌクレオチドのヒトポリペプチド相同体を提供する。さらに本発明は発現ベクター、宿主細胞およびこれらの製造方法を提供する。本発明はまた、ヒトの疾病または症状の治療に有用なPAK5アゴニスト/アンタゴニストを同定する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) 配列番号 1、またはその断片；
(b) 配列番号 2、またはその断片；
(c) 配列番号 1、または配列番号 2 の少なくとも一部と相補的な配列；
(d) 配列番号 1 もしくは配列番号 2 と相同的な配列、またはその断片；
(e) 配列番号 3 を含むポリペプチドをコードする配列、またはその断片；および
(f) 配列番号 3 と相同的なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列、またはその断片
からなる群より選ばれるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 2】 前記核酸分子が DNA である請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】 前記核酸分子が RNA である請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】 前記ヌクレオチド配列が配列番号 2 を含む請求項 2 に記載の核酸分子。

【請求項 5】 前記分子が配列番号 1 または配列番号 2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】 前記オリゴヌクレオチドが配列番号 1 または配列番号 2 の調節領域に対するオリゴヌクレオチドである請求項 5 に記載の核酸分子。

【請求項 7】 請求項 1 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 8】 前記核酸分子が配列番号 2 を含む請求項 7 に記載の発現ベクター。

【請求項 9】 前記ベクターがプラスミドである請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 10】 前記ベクターがウイルス粒子である請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 11】 前記ベクターが、アデノウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アデノ関連ウイルス、セムリキフォレストウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスからなる群より選ばれる請求項 10 に記載のベクター。

【請求項 12】 前記核酸分子が、シミアンウイルス 40、マウス乳腺腫瘍ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの末端繰り返し配列 (LTR)、マロニーウイルス、サイトメガロウイルス前早期プロモーター、エプスタインバーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、およびヒトメタロチオネインからなる群より選ばれるプロモーターとき機能的に結合している請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 13】 請求項 7 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 14】 前記細胞がバクテリア細胞である請求項 13 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 15】 前記バクテリア細胞が大腸菌 (*E. coli*) である請求項 14 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 16】 前記細胞が酵母である請求項 13 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 17】 前記酵母が *S. cerevisiae* である請求項 16 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 18】 前記細胞が昆虫細胞である請求項 13 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 19】 前記昆虫細胞が *S. frugiperda* である請求項 18 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 20】 前記細胞が哺乳類細胞である請求項 13 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 21】 前記哺乳類細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa 細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト 293 細胞及びネズミ 3T3 繊維芽細胞からなる群より選ばれる請求項 20 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 22】 a) 請求項 7 に記載の組換え発現ベクターを適合する宿主細胞に導入するステップと、

b) 前記宿主細胞を前記ポリペプチドが発現する条件下で培養するステップと、

c) 前記宿主細胞から前記ポリペプチドを回収するステップ

とを含む、配列番号 3 を含むポリペプチド、またはその相同体またはそれらの

断片の製造方法。

【請求項 23】 前記宿主細胞を溶解し、前記宿主細胞の溶解物から前記ポリペプチドを回収する請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】 培地を精製することにより宿主細胞を溶解させずに前記宿主細胞から前記ポリペプチドを回収する請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】 請求項 1 に記載の核酸分子および許容される担体または希釈剤を含む組成物。

【請求項 26】 請求項 7 に記載の組換え発現ベクターおよび許容される担体または希釈剤を含む組成物。

【請求項 27】 請求項 1 に記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチド。

【請求項 28】 前記ポリペプチドが配列番号 3 を含む請求項 27 に記載のポリペプチド。

【請求項 29】 前記ポリペプチドが配列番号 3 と相同的なアミノ酸配列を含む請求項 27 に記載のポリペプチド。

【請求項 30】 前記配列番号 3 と相同的なアミノ酸配列が、配列番号 3 と比較して少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を含む請求項 29 に記載のポリペプチド。

【請求項 31】 前記ポリペプチドが配列番号 3 の断片を含む請求項 27 に記載のポリペプチド。

【請求項 32】 請求項 27 に記載のポリペプチドおよび許容される担体または希釈剤を含む組成物。

【請求項 33】 請求項 27 に記載のポリペプチド上の抗原決定基と結合する単離された抗体。

【請求項 34】 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 33 に記載の抗体。

【請求項 35】 請求項 33 に記載の抗体および許容される担体または希釈剤を含む組成物。

【請求項 36】 請求項 27 に記載のポリペプチドと結合する抗体およびネ

ガティブコントロール抗体を含むキット。

【請求項 37】 さらにキット構成物を含む請求項 36 に記載のキット。

【請求項 38】 さらにキット構成物が指示書である請求項 37 に記載のキット。

【請求項 39】 哺乳類において請求項 27 に記載のポリペプチドに対する免疫応答を誘導する方法であって、前記哺乳類に前記免疫応答を誘導するのに十分な量の前記ポリペプチドを投与することを含む方法。

【請求項 40】 PAK5 と結合する化合物の同定方法であって、
a) PAK5 を化合物と接触させるステップと、
b) 前記化合物が PAK5 と結合するかを決定するステップ
とを含む方法。

【請求項 41】 前記化合物の PAK5 への結合がタンパク質結合検定法により決定される請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】 前記タンパク質結合検定法が、ゲルシフト検定法、ウエスタンブロット、放射性標識競合検定法からなる群より選ばれる請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】 PAK5 をコードする核酸分子と結合する化合物を同定する方法であって、
a) PAK5 をコードする核酸分子を化合物と接触させるステップと、
b) 前記化合物が核酸分子と結合するかを決定するステップと
を含む方法。

【請求項 44】 前記結合がゲルシフト検定法により決定される請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】 PAK5 の活性を調節する化合物の同定方法であって、
a) PAK5 を化合物と接触させるステップと、
b) PAK5 の活性が調節されたかを決定するステップ
とを含む方法。

【請求項 46】 前記活性がセリン／トレオニンキナーゼ活性である請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】 前記活性が P A K 5 依存性の細胞生物学的応答である請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】 請求項 40 に記載の方法により同定される化合物。

【請求項 49】 請求項 43 に記載の方法により同定される化合物。

【請求項 50】 請求項 45 に記載の方法により同定される化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、一部には、p21-活性化キナーゼ5をコードする核酸分子、新規なポリペプチド、およびp21-活性化キナーゼ5と結合するか、および／またはp21-活性化キナーゼ5の活性を調節する化合物をスクリーニングする測定方法を対象とする。

【0002】

発明の背景

セリントレオニンキナーゼのp21活性化キナーゼ(PAK)ファミリー(BagrodiaとCerioneによる総説「Trends in Cell Biology」, vol. 9, pp. 350-355, 1999、およびこれに含まれる参考文献)は、現在、4種のPAK1(PAK α としても知られている。)、PAK2(PAK γ としても知られている。)、PAK3(PAK β としても知られている。)およびPAK4からなる。PAKのキナーゼ活性は、Cdc42およびp21Rac(以下、Racと呼ぶ。)のGTP結合体への結合により刺激される。PAKタンパク質のC末端領域はキナーゼ触媒性ドメイン(これはファミリー内の異なるメンバー間で最も高い保存度を示す。)を含んでいる。N末端領域は、Cdc42とRacのGTPアーゼへの結合要因であると考えられる保存されたモチーフ(‘GBD/CRIB’モチーフ、Burbell et al., Journal of Biological Chemistry vol. 270, pp. 29071-29074, 1995)を含む。PAKはまた、そのN末端領域にSH3タンパク質ドメインとの結合部位を表わすPXXPタンパク質モチーフのコピーを数個含んでいる。PAK1~3は、キナーゼを触媒的な不活化を維持するためのN末端調節領域(Cdc42/Rac結合ドメインと重複している。)を有することが示された。最近、PAKタンパク質は2種類のSH3ドメイン含有タンパク質、p85Coo1-1/ β Pixおよび α PIX/Coo1-2との高親和性結合のためにN末端領域内配列を利用することが示された(Manser et al., Mol. Cell

vol. 1 pp. 183-192, 1998、および Bagrodia et al., J. Biol. Chem. Vol 273, pp. 23633-23636, 1998)。p85Coo1-1/ β Pixは周辺性の焦点複合体 (focal complex) に局在化し、細胞質からこれらの錯体にPAK1を補充すること、一方、p85Coo1-1/ β Pixとは異なるスプライシングによって得られるp50Coo1-1はPAK3と結合し、そのキナーゼ活性を阻害するらしいことが発見された。Coo12/ α PIXは、未解明のメカニズムによりPAK活性を刺激する。最近、Cat-1およびCat-2と命名された2種類のチロシンリン酸化タンパク質 (Coo1-associated tyrosine phosphorylated proteins 1 and 2, Bagrodia et al., J Biol Chem vol. 274 pp. 22393-400, 1999) が、p85Coo1-1/ β PixおよびCoo1-2/ α PIXとは相互作用するがp50Coo1-1とはしないことが発見された。したがって、Cat-1とCat-2がPAK活性を高めるCoo1/Pix体とのみ相互作用することから、これらはPAKの調節に極めて重要な役割を果たしていると思われる。

【0003】

これらの相互作用に加えて、PAKタンパク質は、SH2/SH3アダプタータンパク質Nckによって、活性化されたチロシンキナーゼ受容体に結合されることが示されている (Bokoch et al., J Biol Chem vol. 271 pp. 25746-9, 1996)。この結合は、成長因子受容体による細胞活性化とPAKのシグナル伝達経路とを結びつけるものかもしれない。Cdc42またはRacと非結合の状態で、スフィンゴシンおよびその他の膜脂質によってPAKキナーゼ活性が刺激され得る点も示されているが (Bokoch et al., J Biol Chem vol. 273, pp. 8137-44, 1998)、これはスフィンゴ脂質代謝産物によって抑制される (Lian et al., J Immunol vol. 161, pp. 4375-81, 1998)。

【0004】

PAK 活性の下流の因果関係も多重的で複雑である。PAK タンパク質は、焦点接触 (focal contact) の組立て、細胞骨格の組織化、神経突起の過成長、葉状仮足 (lamellipodia) 形成、膜のラフリング (波立たせること)、細胞の運動性および形態の調節に影響することが見出されている。PAK が、核のマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) を活性化することも分かっており、重要なことには、Ras タンパク質下流のエフェクターであるキナーゼ Raf1 をリン酸化する。実際、キナーゼ非機能性 PAK 変異体は、変異 Ras の腫瘍形成性活性を復帰させる (Tang et al., Proc Natl Acad Sci USA vol. 95, pp. 5139-44, 1998)。さらに、PAK は、T 細胞受容体の刺激の後に活性化され、ERK2 および NFAT 転写因子の活性化のために必要であり、したがって、T 細胞受容体による遺伝子発現に必要である (Yablonski et al., EMBO J vol. 17 pp 5647-57, 1998)。

【0005】

要するに、PAK タンパク質は多様性調節的入力を受けて多様な下流エフェクターにシグナル伝達し、これらは多くの細胞の形態、運動性／移動性、増殖、分化または細胞死の基本となるシグナル伝達経路において不可欠である。

【0006】

本発明は、ここでは p21 活性化キナーゼ 5 (以下、「PAK5」と呼ぶ。) として表す新規なポリペプチド、並びに、例えば、細胞増殖、細胞移動、細胞分化、細胞骨格の形成、遺伝子の発現、細胞周期進行および細胞死の調節の要となるその役割についての意外な発見を含んでいる。このように、PAK5 は、これらのプロセスを修飾し、および／または制御することが可能であり、新しい薬剤の探索において有用である。これらおよび本発明の他の態様を以下に説明する。

【0007】

発明の要約

本発明は、一部として、配列番号 1、またはその断片；配列番号 2、またはその断片；配列番号 1 または配列番号 2 の少なくとも一部と相補的なヌクレオチド配列；配列番号 1 もしくは配列番号 2 と相同的なヌクレオチド配列またはその断

片；配列番号 3 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列またはその断片；または、配列番号 3 と相同的なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはその断片を含む単離された核酸分子を対象とする。

【 0 0 0 8 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを対象とする。

【 0 0 0 9 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞を対象とする。

【 0 0 1 0 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを適合的な宿主細胞に導入し、宿主細胞をポリペプチドが発現するのに適した条件下で成育させ、ポリペプチドを宿主細胞から回収することによる、配列番号 3 を含むポリペプチド、またはその相同体またはその断片の製造方法を対象とする。

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかおよび許容される担体または希釈剤を含む組成物を対象とする。

【 0 0 1 2 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによってコードされる単離されたタンパク質を対象とする。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドおよび許容される担体または希釈剤を含む組成物を対象とする。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチド上の抗原決定基と結合する単離された抗体を対象とする。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドと結合する抗体およびネガティブコントロール抗体を含むキットを対象とする。

【 0 0 1 6 】

本発明はまた、哺乳類において上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチドに対して免疫応答を誘導する方法であって、哺乳類に免疫応答を誘導するのに十分な量のポリペプチドを投与することを含む方法を対象とする。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、P A K 5 を化合物と接触させ、化合物が P A K 5 と結合するかを決定することによる P A K 5 と結合する化合物の同定方法を対象とする。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、P A K 5 を化合物と接触させ、化合物が核酸分子と結合するかを決定する P A K 5 をコードする核酸分子と結合する化合物の同定方法を対象とする。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、P A K 5 を化合物と接触させ、化合物が P A K 5 の活性を調節するか決定することによる P A K 5 の活性を調節する化合物の同定方法を対象とする。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、P A K 5 を化合物と接触させ、化合物が P A K 5 の活性を調節するか、P A K 5 と結合するか、または、核酸分子と結合するかを決定することによって同定される P A K 5 活性を調節する化合物を対象とする。

【 0 0 2 1 】

これらおよび本発明の他の態様を以下により詳細に説明する。

【 0 0 2 2 】

最適実施形態の詳細な説明

本発明は、特に、P A K 5 またはその部分をコードする単離され精製されたポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含むベクター、これらのベクターで形質転換された宿主細胞、P A K 5 の製造方法、上記のポリヌクレオチドおよびベクターを使用する方法、単離され精製された P A K 5 、P A K 5 活性を調節する化合物のスクリーニング方法を提供する。

【 0 0 2 3 】

この文書の全体にわたって様々な定義がなされる。ほとんどの単語は当業者がそれらの単語によって意図するであろう意味を有する。以下に、またはこの文書の他の場所で特に定義される単語は、全体として本発明の文脈において与えられ、典型的には当業者によって理解される意味を有する。

【0024】

本明細書では、「活性」とは、直接的であれまたは間接であれ、結合すること；応答に影響を与えること、すなわち、ある種の暴露や刺激に対する応答性に影響を有することを示唆しまたは示す様々な測定可能な指標を指す。例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接結合する化合物の親和性、あるいは、例えば、上流もしくは下流のタンパク質またはその他の同様の刺激または事象後の機能の測定量が含まれる。

【0025】

本明細書では、「キナーゼ活性」とは、本発明たんぱく質の、プリンヌクレオチド三リン酸塩のァーリン酸塩タンパク質基質水酸基への転移能を指す。

【0026】

本明細書では、小文字の略語 p a k 5 は遺伝子、c D N A、R N A または核酸配列を指し、一方、大文字で表された P A K 5 は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、オリゴペプチドまたはアミノ酸配列を指す。

【0027】

本明細書では、「抗体」という用語は、完全な抗体、F a b 断片および F (a b)₂ 断片を指すことを意図している。完全な抗体の例に、ネズミモノクローナル抗体のようなモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体が含まれる。

【0028】

本明細書では、「結合」という用語は、2種類のタンパク質または化合物または関連するタンパク質または化合物あるいはそれらの組み合わせの間における物理的または化学的な相互作用を意味する。結合は、イオン結合、非イオン結合、水素結合およびファンデルワールス疎水性相互作用などを含む。物理的な相互作用、結合は、直接的でも間接的でもよく、間接的とは、別のタンパク質または化合物を介するものでもその結果によるものでもよい。直接的結合は、別のタンバ

ク質または化合物を介しあるいはその結果によって起こるのではなく、他の実質的な化学的媒介物がない相互作用を指す。

【0029】

本明細書では、「化合物」という用語は、あらゆる同定可能な化学物質または分子をも意味し、これらに限定されるものではないが、小分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチドまたは核酸を含む（このような化合物は天然物でも合成物でもよい）。

【0030】

本明細書では、「相補的」という用語は、核酸分子のヌクレオチド単位間で対になるワトソンクリック塩基を指す。

【0031】

本明細書では、「接触させる」という用語は、ある化合物を、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに、直接的又は間接的に物理的に近接させることを意味する。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、任意数のバッファー、塩類、溶液中のものであり得る。接触させることには、例えば、ビーカー、マイクロタイプレート、細胞培養フラスコ、あるいは遺伝子チップのようなマイクロアレイその他（但し、これらはPAK5またはその断片をコードする核酸分子あるいはポリペプチドを含むものである）の中に化合物を置くことが含まれる。

【0032】

本明細書では、「相同的なヌクレオチド配列」または「相同的なアミノ酸配列」という語句またはその変形は、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおいて、配列番号1または配列番号2の全体、またはポリペプチドをコードする機能性ドメインをコードする配列番号1または配列番号2の少なくとも一部、あるいは配列番号3と、少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%の相同性によって特定される配列を指す。相同的ヌクレオチド配列は、PAK5タンパク質のアイソフォームをコードする配列を含む。このようなアイソフォームは、例えばRNAの異なるスプライシングの結果、同じ生物の異なる組織において発現することができる。あるいは、アイソ

フォームは異なる遺伝子によってコードされ得る。相同的なヌクレオチド配列は、ヒト以外の哺乳動物の種（但し、それに限定されるものではない）の PAK5 タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。相同的なヌクレオチド配列は、ここに述べたヌクレオチド配列について自然に存在する対立形質の変異体および変異を含むが、これらに限定されるものではない。しかしながら、相同的なヌクレオチド配列はヒトの PAK1（配列番号4）、PAK2（配列番号5）、PAK3（配列番号6）または PAK4（配列番号7）をコードするヌクレオチド配列は含まない。相同的なアミノ酸配列は、配列番号3において保存的アミノ酸置換をコードするアミノ酸配列を含むとともに、PAK5様キナーゼ活性を有するか、PAK5に特徴的な結合活性を有するポリペプチドも含む。相同性の割合（パーセンテージ）は、例えば、スミスおよびウォーターマン（Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489。その内容全体を参照によって本明細書に組み入れる）のアルゴリズムを使用する、デフォルト設定でのギャッププログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix用 Version 8, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI）を用いて決定することができる。関連する既知分子への本発明の相同性については後述する。

【0033】

本明細書では、用語「単離された」核酸分子という用語は、その本来の環境から取り除かれた核酸分子（DNAまたはRNA）を指す。単離された核酸分子の例には、ベクターに含まれる組換えDNA分子、異種宿主細胞中に維持された組換えDNA分子、部分的にまたは実質的に精製された核酸分子、および合成DNAまたはRNA分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0034】

本明細書では、「調節する」または「修飾する」という用語は、特定の活性またはタンパク質の量、質または効力における増加または減少を意味する。

【0035】

本明細書では、「オリゴヌクレオチド」という用語は、ポリメラーゼ連鎖反応

(P C R) で使用するに十分な数の塩基を有する一連の結合したヌクレオチド残基を指す。この短い配列は、ゲノムか c D N A 配列に基づき (またはこれから設計され) 、特定の細胞または組織中の D N A または R N A と同一、類似または相補的なものの存在量を増幅するか、確認するか、明らかにするために使用される。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約 1 0 個のヌクレオチドかつ最大約 5 0 個までのヌクレオチド、好ましくは 1 5 ~ 3 0 個のヌクレオチドを有する D N A 配列の部分を含む。これらは化学的に合成し、プローブとして使用してもよい。

【 0 0 3 6 】

本明細書では、「プローブ」という用語は、使用態様に依存するが、好ましくは少なくとも約 1 0 個かつ最大約 6 , 0 0 0 個までのヌクレオチドを含む可変長さの核酸配列を指す。それらは、同一の、類似の、または相補的な核酸配列の検出に使用される。通常、より長いプローブが天然として又は組換えとして得られるが、これらはオリゴマーよりも高度に特異的であるもののオリゴマーよりハイブリダイズするのがはるかに遅い。それらは一本鎖または二本鎖構造で、P C R 、メンブランハイブリダイゼーションまたは E L I S A のような方法において特異性を有するように注意深く設計される。

【 0 0 3 7 】

本明細書では、「ストリンジェントなハイブリダイズ条件」または「ストリンジェントな条件」という語句はプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドがその標的配列にはハイブリダイズするが他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存で、状況が異なれば異なってくる。特に、長い配列は高温でもハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度および p H において、特定の配列について、その熱融点 (T m) より約 5 ℃ 低い温度に選択される。T m は標的配列に相補的なプローブの 5 0 % が標的配列にハイブリダイズして平衡状態にある (定義されたイオン強度、p H および核酸濃度の下で) の温度である。一般に標的配列は過剰量存在するので、T m では、プローブの 5 0 % は平衡状態では占められる。典型的には、ストリンジェントな条件は塩の濃度がナトリウムイオン約 1 . 0 M 未満であり、典型的に、p H 7 . 0 ~ 8 . 3 でナトリウムイオン (または他の塩類)

は約0.01～1.0Mであり、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば10～50個のヌクレオチド）では温度が少なくとも約30℃、より長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドでは少なくとも約60℃である。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によって達成してもよい。

【0038】

アミノ酸配列はアミノからカルボキシルに向けて、左から右に示される。アミノ基とカルボキシル基は配列には示されない。ヌクレオチド配列は5'から3'の方向に、左から右に1本鎖でのみ示される。ヌクレオチドとアミノ酸は、IUPAC-IUBの生化学命名法委員会が推奨する方法または（アミノ酸については）3文字コードで表わされる。

【0039】

本発明はその1つの態様では、PAK5をコードする新規なヌクレオチド配列を含む核酸分子を対象とする。核酸分子は好ましくはRNAまたはDNAのいずれかであるが、RNAおよびDNAモノマーの両方やペプチド核酸モノマーを含んでもよい。核酸分子は1本鎖でも2本鎖でもよい。核酸分子のモノマーは、従来のホスホジエステル結合によって連結されていてもよいが、これを修飾した結合、例えば、ホスホロチオエイト（phosphorothioate）結合その他のまたはそれを修飾した結合によって連結されていてもよい。さらに、モノマーの糖部分は、例えば2'の置換によって修飾されていてもよい。これによりヌクレアーゼ抵抗性および／または細胞吸収性の付与を助ける。

【0040】

本発明の好ましい実施形態では、核酸分子は配列番号1—2511塩基長で、PAK5をコードするおよそ2157個のヌクレオチド（配列番号1のうち約352番目～約2508番目）のオープンリーディングフレーム（ORF）を含む—を含む。あるいは、核酸分子は、配列番号1の断片を含む。好ましくは、この断片は約10から約100のヌクレオチドまで、約101から約200のヌクレオチドまで、約201から約300のヌクレオチドまで、約301から約400のヌクレオチドまで、約401から500のヌクレオチドまで、約501か

ら約600のヌクレオチドまで、約601から約700のヌクレオチドまで、約701から約800のヌクレオチドまで、約801から約900のヌクレオチドまで、約901から約1000のヌクレオチドまで、約1001から約1100のヌクレオチドまで、約1101から約1200のヌクレオチドまで、約1201から約1300のヌクレオチドまで、約1301から約1400のヌクレオチドまで、約1401から約1500のヌクレオチドまで、約1501から約1600のヌクレオチドまで、約1601から約1700のヌクレオチドまで、約1701から約1800のヌクレオチドまで、約1801から約1900のヌクレオチドまで、約1901から約2000のヌクレオチドまで、約2001から約2100のヌクレオチドまで、約2101から約2200のヌクレオチドまで、約2201から約2300のヌクレオチドまで、約2301から約2400のヌクレオチドまで、約2401から約2500のヌクレオチドまで、約2501～約2511までおよびこれらの任意の組み合わせを含む。断片は配列番号1のあらゆる部分に位置してよい。したがって、本発明は、少なくとも14個、好ましくは少なくとも16、18、20、25、50または75個の連続するヌクレオチドを含むPAK5の断片を提供する。

【0041】

本発明の別の好ましい実施形態では、核酸分子は配列番号2——2157塩基長で、上記ORF（配列番号1内の約352番目から約2508番目）を含む——を含む。あるいは、核酸分子は、配列番号2の断片を含む。好ましくは、この断片は約10から約100のヌクレオチドまで、約101から約200のヌクレオチドまで、約201から約300のヌクレオチドまで、約301から約400のヌクレオチドまで、約401から500のヌクレオチドまで、約501から約600のヌクレオチドまで、約601から約700のヌクレオチドまで、約701から約800のヌクレオチドまで、約801から約900のヌクレオチドまで、約901から約1000のヌクレオチドまで、約1001から約1100のヌクレオチドまで、約1101から約1200のヌクレオチドまで、約1201から約1300のヌクレオチドまで、約1301から約1400のヌクレオチドまで、約1401から約1500のヌクレオチドまで、約1501から約1600

のヌクレオチドまで、約 1601 から約 1700 のヌクレオチドまで、約 1701 から約 1800 のヌクレオチドまで、約 1801 から約 1900 のヌクレオチドまで、約 1901 から約 2000 のヌクレオチドまで、約 2001 から約 2100 のヌクレオチドまで、約 2101 から約 2157 までおよびこれらの任意の組み合わせを含む。断片は配列番号 2 の任意の部分に位置することができる。

【0042】

本発明の別の好ましい実施形態では、核酸分子は、配列番号 1 または配列番号 2 の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を含む。好ましくは、核酸分子は、配列番号 1 または配列番号 2 の中で挙げられた配列全体に相補的なヌクレオチド配列を含む。あるいは、核酸分子は、配列番号 1 または配列番号 2 の部分に相補的な（つまり、上記断片のいずれかに相補的な）ヌクレオチド配列を含む。配列番号 1 または配列番号 2 の少なくとも一部に相補的な配列の例には、配列番号 1 または配列番号 2 の少なくとも一部にストリンジェントなハイブリダイズ条件の下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが含まれる。好ましいオリゴヌクレオチドは、少なくとも約 10 個のヌクレオチドかつ最大約 50 個のヌクレオチドを含み、好ましくは約 15～30 個のヌクレオチドを含む。それらは化学的に合成され、プローブ、プライマー、アンチセンス剤として使用することができる。

【0043】

本発明の別の好ましい実施形態では、核酸分子は、配列番号 1 または配列番号 2 に相同的なヌクレオチド配列を含む。好ましくは、ヌクレオチド配列は、配列番号 1 または配列番号 2 の全体に少なくとも約 60%、より好ましくは少なくとも約 70%、より好ましくは少なくとも約 80%、より好ましくは少なくとも約 90%、そして最も好ましくは少なくとも約 95% 相同的なヌクレオチド配列である。あるいは、ヌクレオチド配列は、配列番号 1 または配列番号 2 がコードするポリペプチドの機能性ドメインをコードするこれらの配列の一部と少なくとも約 60%、より好ましくは少なくとも約 70%、より好ましくは少なくとも約 80%、より好ましくは少なくとも約 90%、そして最も好ましくは少なくとも約 95% 相同的なヌクレオチド配列である。さらに、配列番号 1 または配列番号 2

に相同的なヌクレオチド配列は、上記長さの配列番号 1 または配列番号 2 の断片を含む。

【 0 0 4 4 】

本発明の別の好ましい実施形態では、核酸分子は、配列番号 3 を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。核酸分子は、好ましくは配列番号 2、または配列番号 2 において遺伝子コードの縮退を反映するコドン置換がなされたものを含む。当業者にはよく知られているように、遺伝子コードには縮退があるため、配列番号 2 によってコードされるのと同じポリペプチドをコードすることができる多数の他の DNA と RNA の分子がある。したがって、本発明は発現時には配列番号 2 のポリペプチドをコードするこれらの他の DNA 分子および RNA 分子を含む。ここに具体的に開示したもの以外の DNA と RNA の分子であっても、特定のアミノ酸に対するコドンの変化によってのみ特定されるものは、本発明の範囲内である。

【 0 0 4 5 】

当業者に周知のように、遺伝子コードには縮退があるため、上記 p a k 5 遺伝子によってコードされるのと同じポリペプチドをコードすることができる多数の DNA と RNA の分子がある。したがって、本発明は発現時には配列番号 3 のポリペプチドをコードするこれらの他の DNA 分子および RNA 分子を含む。P A K 5 遺伝子によってコードされるアミノ酸残基配列を特定したため、個々の具体的なアミノ酸残基すべての三つ組コドンについての知識によれば、こうしたコードを行う RNA および DNA 配列についてすべて記述することは可能である。ここに具体的に開示したもの以外の DNA と RNA の分子であっても、特定のアミノ酸に対するコドンの変化によってのみ特定されるものは、本発明の範囲内である。

【 0 0 4 6 】

アミノ酸およびそれらの表わす略号、記号およびコドンをもとめた表を、下記表 1 に示す。

【 0 0 4 7 】

【 表 1 】

表 1

アミノ酸	略号	記号	コドン
アラニン	A l a	A	G C A GCC GCG GCU
システイン	C y s	C	U G A UGU
アスパラギン酸	A s p	D	G A C GAU
グルタミン酸	G l u	E	G A A GAG
フェニルアラニン	P h e	F	U U C UUU
グリシン	G l y	G	G G A GGC GGG GGU
ヒスチジン	H i s	H	C A C CAU
イソロイシン	I l e	I	A U A AUC AUU
リジン	L y s	K	A A A AAG
ロイシン	L e u	L	U U A UUG CUA CUC CUG CUU
メチオニン	M e t	M	A U G
アスパラギン	A s n	N	A A C AAU
プロリン	P r o	P	C C A CCC CCG CCU
グルタミン	G l n	Q	C A A CAG
アルギニン	A r g	R	A G A AGG CGA CGC CGG CGU
セリン	S e r	S	A G C AGU UCA UCC UCG UCU
トレオニン	T h r	T	A C A ACC ACG ACU
バリン	V a l	V	G U A GUC GUG GUU
トリプトファン	T r p	W	U G G
チロシン	T y r	Y	U A C UAU

【 0 0 4 8 】

当業者に周知のように、m R N A 分子中でコドンは、三つ組のヌクレオチド配列からなり、例えば、塩基チミジン（T）（これはD N A 分子中に存在する）が塩基ウラシル（U）に代替されていることにより特定される。ポリヌクレオチド内の同じアミノ酸残基に対するコドンの単純な変化は、コードされたポリペプチドの配列や構造を変更するものではない。

【 0 0 4 9 】

あるいは、核酸分子は、配列番号3をコードするポリペプチドの断片をコードするヌクレオチド配列を含む。好ましくは、この断片は、約5から約20のアミノ酸まで、約21から約40のアミノ酸まで、約41から約60のアミノ酸まで、約61から約80のアミノ酸まで、約81から約100のアミノ酸まで、約1

01から約120のアミノ酸まで、約121から約140のアミノ酸まで、約141から約160のアミノ酸まで、約161から約180のアミノ酸まで、約181から約200のアミノ酸まで、約201から約220のアミノ酸まで、約221から約240のアミノ酸まで、約241から約260のアミノ酸まで、約261から約280のアミノ酸まで、約281から約300のアミノ酸まで、約301から約320のアミノ酸まで、約321から約340のアミノ酸まで、約341から約360のアミノ酸まで、約361から約380のアミノ酸まで、約381から約400のアミノ酸まで、約401から約420のアミノ酸まで、約421から約440のアミノ酸まで、約441から約460のアミノ酸まで、約461から約480のアミノ酸まで、約481から約500のアミノ酸まで、約501から約520のアミノ酸まで、約521から約540のアミノ酸まで、約541から約560のアミノ酸まで、約561から約580のアミノ酸まで、約581から約600のアミノ酸まで、約601から約620のアミノ酸まで、約621から約640のアミノ酸まで、約641から約660のアミノ酸まで、約661から約680のアミノ酸まで、約681から約700のアミノ酸まで、約701から約719のアミノ酸まで、およびこれらの任意の組み合わせを含む。断片は配列番号3の任意の部分内に位置することができる。

【0050】

本発明の別の好ましい実施形態では、核酸分子は、配列番号3と相同的なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。あるいは、核酸分子は、配列番号3と相同的なアミノ酸配列を含むポリペプチドの断片をコードするヌクレオチド配列を含む。好ましくは、この断片は、約5から約20のアミノ酸まで、約21から約40のアミノ酸まで、約41から約60のアミノ酸まで、約61から約80のアミノ酸まで、約81から約100のアミノ酸まで、約101から約120のアミノ酸まで、約121から約140のアミノ酸まで、約141から約160のアミノ酸まで、約161から約180のアミノ酸まで、約181から約200のアミノ酸まで、約201から約220のアミノ酸まで、約221から約240のアミノ酸まで、約241から約260のアミノ酸まで、約261から約280のアミノ酸まで、約281から約300のアミノ酸まで、

約301から約320のアミノ酸まで、約321から約340のアミノ酸まで、約341から約360のアミノ酸まで、約361から約380のアミノ酸まで、約381から約400のアミノ酸まで、約401から約420のアミノ酸まで、約421から約440のアミノ酸まで、約441から約460のアミノ酸まで、約461から約480のアミノ酸まで、約481から約500のアミノ酸まで、約501から約520のアミノ酸まで、約521から約540のアミノ酸まで、約541から約560のアミノ酸まで、約561から約580のアミノ酸まで、約581から約600のアミノ酸まで、約601から約620のアミノ酸まで、約621から約640のアミノ酸まで、約641から約660のアミノ酸まで、約661から約680のアミノ酸まで、約681から約700のアミノ酸まで、約701から約719のアミノ酸まで、およびこれらの任意の組み合わせを含む。断片は配列番号3の任意の部分内に位置することができる。

【0051】

本発明で示されたヌクレオチド配列情報についての知識を用いれば、当業者は異なる出所（つまり異なる組織または異なる生物）から、PAK5をコードするどのようなヌクレオチド配列をも同定することが可能であり、これは、当業者に周知な様々な手段、および、例えば、Sambrook et al., "Molecular cloning: a laboratory manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)（その全体を参照によって本明細書に組み入れる）に開示された手段によって行うことができる。

【0052】

例えば、PAK5をコードするDNAは、ここに提供されるPAK5遺伝子配列情報から生成されオリゴヌクレオチドプローブによって、mRNA、cDNAまたはゲノムのDNAをスクリーニングすることにより得ることができる。プローブは、例えばSambrookらに記載されているような、当業者に公知の従来のハイブリダイゼーションアッセイの方法に従って、蛍光発光性基、放射性原子または化学発光性基などの検出可能な基で標識してもよい。

【0053】

あるいは、上記 PAK5 ヌクレオチド配列のうちいずれかを含む核酸分子は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の手法を使用し、ここに提供されるヌクレオチド配列から生産された PCR オリゴヌクレオチドプライマーを用いて回収することもできる。Mullis への米国特許第 4,683,195 号および Mullis への米国特許第 4,683,202 号参照。PCR 反応は、その配列が事前に精製されておらず、特定の試料中に単一コピーしか存在しない場合であっても、特定の核酸配列の濃度を選択的に増加させる方法を提供する。この方法は 1 本鎖または 2 本鎖 DNA のいずれの増幅にも使用することができる。この方法の本質的部分には、2 個のオリゴヌクレオチドプローブをプライマーとして用い、所望の核酸分子についてテンプレート依存性でポリメラーゼを媒介とした複製を行うことが含まれる。

【0054】

多様な代替クローニングおよび *in vitro* 増幅の方法論は当業者に周知である。これらの技術は、例えば、Berger et al., Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger) に参照でき、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。

【0055】

本発明の核酸分子およびそこから由来する断片は、ある種の疾患に関連した、制限酵素断片長多型 (RFLP) のスクリーニング、および遺伝子地図作成に有用である。

【0056】

PAK5 をコードする本発明のヌクレオチド配列に由来する、アンチセンスオリゴヌクレオチド、または配列番号 1 または配列番号 2 の断片、またはそれらに相補的な配列は、多様な組織での遺伝子発現をプローブするための診断用ツールとして有用である。例えば、ある組織に関連する酵素の固有の発現または病理学的条件を研究するために、慣用のオートラジオグラフィ技術によって検出でき

る基を含むオリゴヌクレオチドプローブを備えたプローブを用いて、原位置で組織をプローブすることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、配列番号1または配列番号2の調節領域（こうしたものには、開始コドン、TATAボックス、エンハンサー配列などが含まれるが、これらに限定されるものではない）またはこれに対応するmRNAを対象とする。

【0057】

pak5のヌクレオチド配列を得るか確認するためには、自動配列決定法を用いた。本発明のpak5ヌクレオチド配列は双方向のDNA鎖について得られ、100%正確であると考えられる。しかしながら、当業者には公知のように、自動決定法によって得られたヌクレオチド配列はいくつかのエラーを含んでいる可能性はある。

【0058】

自動決定法によって決定されたヌクレオチド配列は、与えられた核酸分子の実際のヌクレオチド配列と典型的には少なくとも約90%、より典型的には少なくとも約95%から少なくとも約99.9%まで同一である。実際の配列は手作業による配列決定法（それらは当業者に周知である）を使用して、より正確に決定することができる。1または複数のヌクレオチドの挿入または削除をもたらす配列中のエラーは、翻訳時のフレームシフトをもたらすため、推定アミノ酸配列は、その変異の場所から核酸分子の実際のヌクレオチド配列から推定されるそれとは異なる。

【0059】

本発明の別の態様は、上記核酸分子のうちのいずれかを含むベクター、すなわち、組換え発現ベクターを対象とする。ここでベクターは、PAK5をコードするDNAまたはRNAを増幅するために、および／またはPAK5をコード化するDNAを発現するために用いられる。好ましいベクターは、プラスミド、ファージ、コスミド、エピソーム、ウイルス粒子またはウイルス、および統合可能なDNA断片（つまり相同的組換えにより宿主ゲノムへ統合することができる断片）を含むが、これらに限定されるものではない。好ましいウイルスの粒子は、アデノウイルス、パーボウイルス、ヘルペスウイルス、ボックスウイルス、アデノ

関連ウイルス、セムリキフォレストウイルス、ワクシニアウイルス、およびレトロウイルスを含むが、これらに限定されない。好ましい発現ベクターとしては、pCDNA3 (Invitrogen) および pSVL (Pharmacia Biotech) が含まれるがこれらに限定されない。他の発現ベクターとしては、pSPORTベクター、pGEMベクター (Promega)、pPROEXベクター (LTI, Bethesda, MD)、Bluescriptベクター (Stratagene)、pQEベクター (Qiagen)、pSE420 (Invitrogen) および pYES2 (Invitrogen) が含まれるがこれらに限定されない。

【0060】

好ましい発現ベクターは複製可能なDNA構築物であり、PAK5コードするDNA配列は、適切な制御配列に機能的 (operably) に連結され適切な宿主中でPAK5の発現を達成することができる。DNAドメインは、機能的な相互関係がある場合、機能的に連結される。例えば、配列の転写を制御するプロモーターは、コードする配列に機能的に連結される。増幅ベクターは発現制御ドメインを必要としないが、宿主中で増殖する能力 (これは通常、複製起点によって付与される) および形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子のみは必要とする。発現ベクター中での制御配列の必要性は、選択された宿主および選択した形質転換方法によって変わるであろう。一般に、制御配列は、転写プロモーター、転写制御する任意のオペレーター配列、適当なmRNA リボゾーム結合をコードする配列、並びに転写および翻訳の終了を制御する配列を含んでいる。

【0061】

好ましいベクターは、好ましくは宿主生物によって認識されるプロモーターを含む。本発明のプロモーター配列は原核生物由来、真核生物由来、ウイルス由来でもよい。適当な原核生物の配列の例は、バクテリオファージラムダのP_RとP_Lのプロモーター (The bacteriophage Lambda, Hershey, A. D., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1973))。その全体を参照によって本明細書に組み入れる。; Lambda II, Hendri

x, R. W., Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1980)。その内容全体を参照によって本明細書に組み入れる。) ; trp、recA、熱衝撃、大腸菌の lacZ プロモーターおよびシミアンウイルス40の初期プロモーター (Benoit, et al Nature, 1981, 290, 304-310。その全体を参照によって本明細書に組み入れる) を含む。さらに、マウス乳腺腫瘍ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの末端繰り返し配列 (LTR)、マロニーウイルス、サイトメガロウイルス前早期プロモーター、エプスタインバールウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、およびヒトメタロチオネインがプロモーターとして含め得るが、これらに限定されるものではない。

【0062】

好ましいベクターは、追加の調節配列も含むことができる。適当な調節配列の好ましい例は、ファージMS-2レプリカーゼ遺伝子のシャイン-ダルガノ配列およびバクテリオファージラムダ遺伝子cI Iのシャイン-ダルガノ配列によって表わされる。PAK5をコードするDNAがシャイン-ダルガノ配列に直接続き、成熟PAK5タンパク質の発現がもたらされるものでもよい。

【0063】

さらに、適当な発現ベクターは、形質転換された宿主細胞のスクリーニングを可能にする適切なマーカーを含むことができる。選択された宿主の形質転換は、当業者に周知の多様な技術のうちのいずれかにより実行され、こうした技術は上掲 Sambrookらに記載されている。

【0064】

複製起点は、外来性の起点を含めるベクターの構築により提供することもできるが、宿主細胞の染色体の複製メカニズムによって提供されるものでもよい。ベクターが宿主細胞染色体へ統合される場合は、後者でも十分であろう。あるいは、ウイルスの複製起点を含むベクターを使用するのではなく、当業者であれば、選択可能なマーカーおよびpak5 DNAを用いた同時形質転換の方法によって哺乳類細胞を形質転換することもできる。適当なマーカーの例は、ジヒドロフ

ォレート還元酵素 (DHFR) またはチミジンキナーゼ (米国特許第4, 399, 216号参照) である。

【0065】

PAK5をコードするヌクレオチド配列は、慣用技術に従ってベクターDNAで組換えてもよい。これには、ライゲーション用の平滑またはスタガード末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な粘着末端の充填、望ましくない結合を避けるための適切なアルカリホスファターゼ処理、および適切りガーゼによるライゲーションが含まれる。このような操作技術は、上記 Sambrookらによって示され、当業者に周知である。哺乳類発現ベクターの構築方法は、例えば、Okayama et al., Mol. Cell. Biol., 1983, 3, 280, Cosman et al., Mol. Immunol., 1986, 23, 935、Cosman et al., Nature, 1984, 312, 768、EP-A-0367566およびWO91/18982に開示されており、これらの各々は参照によってその全体が本明細書に組み入れる。

【0066】

本発明の別の態様は、上記の核酸分子のいずれかを含む発現ベクターを含む形質転換された宿主細胞を対象とする。発現ベクターが適切な宿主細胞へ導入されると、ヌクレオチド配列の発現が生じる。本発明のポリペプチド発現のために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母および真核生物を含むが、これらに限定されない。原核生物の発現ベクターが使用される場合、適切な宿主細胞はクローニング配列を発現することができる任意の原核細胞になるであろう。適切な原核細胞は、Escherichia、Bacillus、Salmonella、Pseudomonas、StreptomycesおよびStaphylococcus属のバクテリアを含むが、これらに限定されない。真核生物の発現ベクターが使用される場合、適切な宿主細胞はクローニング配列を発現することができる任意の真核細胞になるであろう。好ましくは、真核細胞は高等真核生物の細胞である。適切な真核細胞は、ヒト以外の哺乳類の組織培養細胞およびヒトの組織培養細胞を含むが、これらに限定されない。好ましい宿主細胞は、昆虫細胞、HeL

a細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、アフリカミドリザル腎臓細胞（COS細胞）、ヒト293細胞、およびネズミ3T3繊維芽細胞を含むが、これらに限定されない。細胞培養におけるこのような細胞増殖は日常業務の操作である（Tissue Culture, Academic Press, KruseおよびPatterson編（1973）参照。その内容全体を参照によって本明細書に組み入れる）。

【0067】

さらに、酵母宿主を宿主細胞として用いてもよい。好ましい酵母細胞は、Saccharomyces、PichiaおよびKluyveromyces属を含むが、これらに限定されない。

【0068】

好ましい酵母宿主はS. cerevisiaeおよびP. pastorisである。好ましい酵母ベクターは、2T酵母プラスミドからの複製起点、自律的複製配列（ARS）、プロモータードメイン、ポリアデニル化配列、転写終了のための配列および選択可能なマーカー遺伝子を含むことができる。酵母および大腸菌の両方における複製に用いるシャトルベクターも本願に含まれる。

【0069】

あるいは、昆虫細胞を宿主細胞として使用してもよい。好ましい実施形態では、本発明のポリペプチドはバキュロウイルス（baculovirus）発現システム（Luckow et al., Bio/Technology, 1988, 6, 47, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, O'Reilly et al.（編）, W. H. Freeman and Company, New York, 1992および米国特許第4,879,236号参照。その各々は参照によってその全体を本明細書に組み入れる。）を使用して発現される。さらに、例えば、MAXBAC（商標）完全バキュロウイルス発現システム（Invitrogen社）を、昆虫細胞内での生産に使用することができる。

【0070】

本発明の別の態様は、上記の核酸分子または組換え発現ベクターと許容される

担体または希釈剤を含む、医薬組成物を含む組成物を対象とする。好ましくは、担体または希釈剤は医薬的に許容可能である。適切な担体は、この分野における標準的テキストである Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol の最新版に記載されており、これはその全体が参照によって本願に組み込まれる。このような担体または希釈剤の好ましい例は、水、食塩水、リンゲル液、ブドウ糖溶液および 5% ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リポソーム、および不揮発性油のような非水性のビヒクルを使用してもよい。処方物は慣用技術によって滅菌される。

【0071】

本発明の別の態様は、上記の核酸分子によってコードされた、単離されたポリペプチドを対象とする。本発明の好ましい実施形態では、単離されたポリペプチドは、配列番号 3 に記載されたアミノ酸配列を含む。あるいは、ポリペプチドは配列番号 3 をコードするポリペプチドの断片である。好ましくは、この断片は、約 5 から約 20 のアミノ酸まで、約 21 から約 40 のアミノ酸まで、約 41 から約 60 のアミノ酸まで、約 61 から約 80 のアミノ酸まで、約 81 から約 100 のアミノ酸まで、約 101 から約 120 のアミノ酸まで、約 121 から約 140 のアミノ酸まで、約 141 から約 160 のアミノ酸まで、約 161 から約 180 のアミノ酸まで、約 181 から約 200 のアミノ酸まで、約 201 から約 220 のアミノ酸まで、約 221 から約 240 のアミノ酸まで、約 241 から約 260 のアミノ酸まで、約 261 から約 280 のアミノ酸まで、約 281 から約 300 のアミノ酸まで、約 301 から約 320 のアミノ酸まで、約 321 から約 340 のアミノ酸まで、約 341 から約 360 のアミノ酸まで、約 361 から約 380 のアミノ酸まで、約 381 から約 400 のアミノ酸まで、約 401 から約 420 のアミノ酸まで、約 421 から約 440 のアミノ酸まで、約 441 から約 460 のアミノ酸まで、約 461 から約 480 のアミノ酸まで、約 481 から約 500 のアミノ酸まで、約 501 から約 520 のアミノ酸まで、約 521 から約 540 のアミノ酸まで、約 541 から約 560 のアミノ酸まで、約 561 から約 580 のアミノ酸まで、約 581 から約 600 のアミノ酸まで、約 601 から約 620 のアミノ酸まで、約 621 から約 640 のアミノ酸まで、約 641 から約 660

のアミノ酸まで、約 661 から約 680 のアミノ酸まで、約 681 から約 700 のアミノ酸まで、約 701 から約 719 のアミノ酸まで、およびこれらの任意の組み合わせを含む。断片は配列番号 3 の任意の部分内に位置することができる。

【0072】

本発明の別の好ましい実施形態では、ポリペプチドは配列番号 3 に相同的なアミノ酸配列または上記のようなその断片を含む。本発明は、ここに記載したヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと相同的であり、同じ生物学的特性を本質的に有するタンパク質、つまり、変異体を含むことが理解されるべきである。この定義は、ここに記述された *pak5* 遺伝子のアイソフォームおよび天然対立形質の変異体を包含することを意図している。これらの変異体は、例えば、同じ生物に由来しつつも異なる組織中で代替スプライシングを受け、または発現の差異に起因するものでもよい。変異体は、例えば、アミノ酸の挿入、削除または置換によって特定されるものでもよい。この意味で、配列番号 3 に少なくとも約 70% 配列相同的な、少なくとも約 80% 配列相同的な、好ましくは約 90% 配列相同的な、より好ましくは約 95% 配列相同的な、そして最も好ましくは約 98% 配列相同的なアミノ酸配列は本発明に含まれるものとして考えられる。好ましい相同的なポリペプチドは、配列番号 3 と比較して、少なくとも 1 つの保存的なアミノ酸置換を含む。アミノ酸の「挿入」、「置換」または「削除」は、アミノ酸配列への、またはその配列内での変更である。特定のアミノ酸配列内で許される変異体は、ペプチドを合成的に生産するか *pak5* 配列で組換え DNA 技術を使用して、ヌクレオチドの挿入、削除または置換を系統的に行うことにより実験的に決定してもよい。

【0073】

天然に存在するアミノ酸配列の変更は、多くの先行技術のいずれかによって遂行することができる。例えば、当業者に周知の方法により、ポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドの特定の位置に変異を導入することが可能であり、こうした方法としては、Walden et al., Gene, 1986, 42, 133, Bauer et al., Gene, 1985, 37, 73, Craik, BioTechniques, January 1985, pp. 12

- 19, Smith et al., Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981) および米国特許第 4, 518, 584 号および第 4, 737, 462 号 (これらのいずれも参照によってその全体が本明細書に組み入れる) に記載されているオリゴヌクレオチドを対象とする突然変異が含まれる。

【 0074 】

好ましくは、本発明の PAK5 変異体は、天然に存在する PAK5 ポリペプチドの生物活性を実質的に示す。「天然に存在する PAK5 ポリペプチドの生物活性を実質的に示す」とは、本発明の範囲内の PAK5 変異体が保存的に置換された配列を含み得ること、つまり、PAK5 ポリペプチドの 1 または複数のアミノ酸残基が、その 2 次構造および／または 3 次構造を変化させないように、別のアミノ酸残基と代替されることを意味する。このような置換は、脂肪族残基 (Ile、Val、Leu または Ala) の 1 つを別のものに置換するか、塩基性アミノ酸 Lys および Arg、酸性残基 Glu および Asp、アミド残基 Gln および Asn、水酸基残基 Ser および Tyr、または芳香族残基 Phe および Tyr 間の置換のような同様の物理化学的特性を有する残基によるアミノ酸の置換を含んでいてもよい。発現では影響を示さないアミノ酸置換に関する詳細情報は、Bowie et al., Science, 1990, 247, 1306-1310 に見出すことができ、これは参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。PAK5 の生物学的活性を実質的に保持する他の PAK5 変異体は、アミノ酸置換が、タンパク質の機能的なドメインの外部で起こっているものである。

【 0075 】

そのような宿主細胞の中で発現されるポリペプチドは、さらに異種起源のタンパク質に由来するドメインを含む融合タンパク質でもよい。そのようなドメインは、例えば、分泌や安定性の改善を可能にし、あるいはポリペプチドの精製を容易にするために含有される。例えば、適切なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクターに結合することができる。シグナルペプチド (分泌性リーダー) の DNA 配列は、ポリペプチドがシグナルペプチドを含む融合タンパク質として翻訳されるように、ポリヌクレオチド配列にフレームごと (in-frame) 融

合されていてもよい。意図した宿主細胞において機能するシグナルペプチドは、ポリペプチドの過剰な細胞外分泌を促進する。好ましくは、シグナル配列は、細胞からポリペプチドが分泌される際にポリペプチドから除去される。このようにして、PAK5のN末端が担体ペプチドに融合されている好適な融合タンパク質を生産することができる。

【 0076 】

1つの実施形態では、ポリペプチドが、ポリペプチドの精製を容易にするために使用される異種起源のドメインを含む融合タンパク質を含む。このような機能に使用される利用可能なペプチドの多くは、結合性パートナーに融合タンパク質を選択的に結合することを可能にするものである。好ましい結合性パートナーは、タンパク質AのIgG（免疫グロブリンG）結合ドメインを1または複数含むもので、これは例えば、IgG結合セファロース上でのアフィニティークロマトグラフィーによって均質に精製される。あるいは、多くのベクターが、目標タンパク質のN末端またはC末端に発現可能なヒスチジン残基の伸長部を担持できるという長所を有する。このように、金属キレート形成クロマトグラフィーでは、興味あるタンパク質を回収することができる。エンテロキナーゼのようなタンパク分解性酵素、因子X、または、プロコラゲナーゼまたはトロンビンの認識部位をコードするヌクレオチド配列を、PAK5配列の直前に設け、融合タンパク質の分裂によって成熟PAK5タンパク質を得ることが可能にしてもよい。融合パートナーの別の例としては、酵母I-因子、sf9昆虫細胞におけるミツバチメラチンリーダー、6-Hisタグ、チオレドキシンタグ、ヘマグルチニンタグ、GSTタグおよびOmpAシグナル配列タグが含まれるが、これらに限定されるものではない。当業者には自明なように、ペプチドを認識しこれに結合する結合性パートナーは、金属イオンを含む任意の分子または化合物（例えば、金属親和性カラム）、抗体またはその断片、およびFLAGタグのようなペプチドに結合する任意のタンパク質またはペプチドでよい。

【 0077 】

本発明のポリペプチドは、抗原に対する抗体として使用したり、PAK5活性を調節する化合物をスクリーニングするために使用することができる。PAK5

も組成物中に使用することができる。従って、本発明は、P A K 5 または本発明による抗体の医薬品としての使用、および、P A K 5 活性が不完全か無秩序な症状に対する医薬品の製造におけるこれら分子の使用に関する。そうした症状には、癌、脈管形成関連疾病、中枢神経系疾病、免疫反応の不适当的活性化による疾病が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明により医薬品として用いる分子は、ここに述べたポリペプチドや抗体のほか、ここに記載するスクリーニング方法において同定された任意の新規物質でもよい。

【 0 0 7 8 】

別の態様では、本発明は、関連する本来のパターンでのグリコシル化、アシル化、シアル化、その他の翻訳後修飾を伴った、または伴わない P A K 5 ポリペプチドに関する。酵母または哺乳類の発現システム（以下に述べる。）で発現される P A K 5 は、本来の P A K 5 ポリペプチドと分子量およびグリコシル化パターンが類似していてもよいし著しく異なってもよい。もちろん、細菌中での P A K 5 発現システムではグリコシル化されていない P A K 5 が提供されることになる。

【 0 0 7 9 】

本発明の別の態様では、上記のいずれかのポリペプチドおよび許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物を含む組成物を対象とする。好ましくは、担体または希釈剤は医薬的に許容されるものである。上記のポリペプチドを含む組成物は、例えば、抗体形成を誘導し、また、例えばワクチン製造に使用される免疫反応を誘導するのに使用することができる。

【 0 0 8 0 】

本発明の別の態様は、上記の組換え発現ベクターのいずれかを適合的な宿主細胞に導入し、宿主細胞をポリペプチドが発現するのに適した条件下で増殖させ、ポリペプチドを宿主細胞から回収することを含む、配列番号 3 を含むポリペプチド、またはその相同体またはそれらの断片の製造方法を対象とする。例えば、グリコシル化、カルボキシル末端のアミド化、ある種のアミノ酸残基の酸化または誘導体化をもたらし様々な処理メカニズムを提供するという点で、真核生物システムが好ましい。

【0081】

本発明のポリペプチドは、好ましくは単離された形で提供され、好ましくは実質的に精製され、最も好ましくは均質に精製される。宿主細胞は好ましくは溶解され、ポリペプチドは宿主細胞の溶解物から回収される。あるいは、宿主細胞を細胞培養媒体から取り除くことにより好ましくは宿主細胞を溶解せずに、ポリペプチドは回収される。ポリペプチドは、よく知られた方法、例えば、硫酸アンモニウムまたはエタノールによる沈殿形成法、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーなどにより、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。

【0082】

組換え技術によってこれらのタンパク質を生産することに加えて、自動アミノ酸合成器も PAK5 ポリペプチドまたはその相同的なタンパク質断片の生産のために使用してもよい。

【0083】

本発明の別の態様は、抗体、またはここに記述されたポリペプチドのうちのいずれかのエピトープに結合する抗体を対象とする。好ましくは、抗体は配列番号 3 のエピトープに結合する。本発明による抗体は、モノクローナル、ポリクローナルのいずれでもよく、個別的、対立形質、株または種の変異体、またはそれらの断片でもよく、天然（短縮していない）および組換えの両方が含まれる。さらに、抗体は、その本来における配置、または本来とは異なる配置で本発明のタンパク質に取り上げられる。抗イディオタイプ抗体も生成することができる。

【0084】

本発明のポリペプチドに結合する抗体を生産するハイブリドーマ、および抗体自体は、ポリペプチドの単離および精製に有用である。さらに、抗体は PAK5 活性の特異的抑制剤ともなり得る。本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、周知技術および入手容易な出発原料を使用して、天然由来のタンパク質の精製に用いることができる。このような抗体も、組換え DNA 方法でタンパク質

を生産する場合に存在する原料からタンパク質を精製するために使用できる。

【0085】

多くの抗体作製方法が、当業者に公知である。モノクローナル抗体の調製技術については、例えば、Stites et al (編集), Basic and Clinical Immunology (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA 参照 (その内容の全体および参考文献を参照によって本明細書に組み入れる)。ファージか同様のベクター中に組換え抗体ライブラリーの選択を含む技術は、Huse et al., Science, 1989, 246, 1275-1281 に記載されており、その内容の全体を参照によって本明細書に組み入れる。例えば、抗体、および完全な全抗体のタンパク質構造、Fab 断片および F(ab)2 断片の生産、およびこのような分子をコードする遺伝子配列の組織化は周知であり、例えば、Harlow, E. および D. Lane (1988) ANTI BODIES: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY にも記載されている (その内容の全体を参照によって本明細書に組み入れる)。端的に言えば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスに注入する。マウスの脾臓を除去し、脾臓細胞を単離し、不死化マウス細胞と融合する。ハイブリッド細胞 (ハイブリドーマ) を培養し、抗体分泌細胞を選択する。抗体を分析し、もし、ポリペプチドに特異的に結合することが判明すれば、それを生産するハイブリドーマを培養することにより抗体を連続的に生産供給する。

【0086】

本発明は、医薬キットを含むキットを対象とする。キットは、上記の核酸分子のうちのいずれか、上記のポリペプチドのいずれか、または上記の本発明のポリペプチドに結合するいずれかの抗体とネガティブコントロール抗体を含むことができる。キットは、好ましくは、例えば、指示書、固形支持体、定量に有用な試薬その他のように、追加的な構成要素を含む。

【0087】

本発明の別の態様は、哺乳動物に免疫反応を誘導するのに十分な量のポリペプ

チドを処方することにより、哺乳動物において本発明のポリペプチドに対する免疫反応を誘導する方法を対象とする。処方量は、動物の種、動物の大きさその他に依存するが、当業者であれば決定できる。

【0088】

本発明の別の態様は、PAK5またはこれをコードする核酸分子を化合物と接触させ、前記化合物がPAK5またはこれをコードする核酸分子と結合するかを決定することを含むPAK5またはPAK5をコードする核酸分子のいずれかに結合する化合物の同定方法を対象とする。結合は、当業者に周知の結合検定法により決定することができる。こうした方法には、ゲルシフト検定法、ウエスタンブロット、放射性標識競争検定法、ファージベースの発現クローニング、クロマトグラフィーによる同時分画、共沈、架橋、相互作用トラップ／2-ハイブリッド分析、サウスウエスタン分析、ELISAその他が含まれるが、これらに限定されない。これらの方法は、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, 1999, John Wiley & Sons, NYに記載されているが、その全体を参照によって本明細書に組み入れる。スクリーニングされる化合物は（それはPAK5、またはこれをコードする核酸分子に結合すると疑われる化合物を含んでもよい。）、細胞外、細胞内、生物学的、または化学的起源の化合物を含むが、これらに限定されない。このようなテストで使用されるPAK5ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、溶液中に遊離状態で、固形支持体上に付着した状態で、または細胞表面に担持され、あるいは、細胞内に局在してもよい。当業者は、例えば、PAK5と供試化合物間での複合体形成を測定することができる。あるいは、当業者は、供試化合物によって引き起こされるPAK5とその基質間の複合体形成の減少を調べることができる。

【0089】

本発明の別の態様は、PAK5を化合物と接触させ、PAK5活性が調節されたかを決定することを含む、PAK5活性を調節する（つまり、増加または減少させる）化合物を同定する方法を対象とする。比較試験がある状態での活性が試験化合物を欠く状態での活性に対して測定される。試験化合物を含む試料の活性

が試験化合物を欠く試料中の活性より高い場合、その化合物は活性を増加させていることになる。同様に、試験化合物を含む試料の活性が試験化合物を欠く試料中の活性より低い場合その、化合物は活性を阻害していることになる。

【 0090 】

本発明は、様々な薬剤をスクリーニングする技術のうちいずれかに PAK5 を使用することにより、化合物をスクリーニングに特に有益である。スクリーニングされる化合物（それは PAK5 活性を調節すると疑われる化合物を含んでもよい。）は、細胞外か、細胞内か、生物学的、または化学的起源のものを含むが、これらに限定されない。このような試験で使用される PAK5 ポリペプチドは、任意の形態でよく、好ましくは、溶液中に遊離状態で、固形支持体上に付着した状態で、または細胞表面に担持され、あるいは、細胞内に位置してもよい。当業者は、例えば、PAK5 と供試化合物間での複合体形成を測定することができる。あるいは、当業者は、供試化合物によって引き起こされる PAK5 とその基質間の複合体形成の減少を調べることができる。

【 0091 】

PAK5 は、ここではセリン／トレオニンタンパク質キナーゼであると予測され、現時点で知られているキナーゼファミリーの中で、以前に記述された STE20 様 PAK キナーゼに対して機能的および構造的な相同性の程度が最も高い。これを強力に示す証拠は、PAK5 タンパク質（配列番号 3）の 1 次構造中にある。例えば、配列番号 3 は、データベース探索プログラムである BLAST シリーズ内の TBLASTN アルゴリズムを使用して、GenBank 配列データベースを探索するために使用された。GenBank は米国国立衛生研究所（NIH: National Institutes of Health）の遺伝子配列データベース（公に利用可能なすべての DNA 配列に注釈を付したコレクション）である（Benson, D. A. et al., Nucleic Acids Research, vol. 27, 12-7, 1999）。1999 年 10 月時点で 4,865,000 の配列レコードにおよそ 3,841,000,000 の塩基がある。GenBank はいくつかの方法によって探索することに利用可能であるが、インターネットを介して、米国国立衛生研究所の国立医学図書

館 (National Library of Medicine) の国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) によって維持される Genbank ウェブサイト (インターネット・アドレス: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) にアクセスできる。GenBank は国際的なヌクレオチド配列データベース共同作業の一部であり、これは日本の DNA データバンク (DDBJ)、ヨーロッパ分子生物学研究所 (EMBL) および NCBI の GenBank で構成される。これらの 3 つの組織は一日単位でデータを交換する。BLAST アルゴリズム (これは Basic Local Alignment Search Tool — 基本的な局所的アラインメント探索ツール — を表す) は、配列類似性を決定するのに適している (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410。これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる)。BLAST 分析を実行するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を介して公に利用可能である。BLAST アルゴリズムは、検索配列中の長さ W のショートワード (これは、データベース配列中の同じ長さのワードと一致したときに一致するか、いくつかの正值の閾値スコア T を満たす) を同定することにより、初めに高スコア配列ペア (HSP: high scoring sequence pair) の同定を行う。T は隣接ワードスコア閾値と呼ばれる (上掲 Altschul et al.)。これらの最初の隣接ワードのヒットは、これを含む HPS の探索を開始する種 (seed) として働く。ワードヒットは各配列について両方向に伸長されるが、この伸長は、1) 累積アラインメントスコアがその最大到達値から量 X だけ外れたとき、2) 累積スコアが、1 または複数の負スコア残基の累積により 0 以下になったとき、3) いずれかの配列の端部に達したとき、停止される。BLAST アルゴリズムのパラメーター W、T および X は、アラインメントの感度および速さを決定する。BLAST アルゴリズムは、デフォルトでは、ワード長さ (W) として 11、BLOSUM62 マトリクス (Henikoff et al.,

, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919 参照。これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M=5、N=4、両方のストランドの比較が用いられる。

【0092】

BLAST アルゴリズム (Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787。これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる) およびギャプト BLAST アルゴリズム (Altschul et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389。これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる) は2つの配列間の類似性を統計的に分析するものである。BLAST アルゴリズムによって提供される類似性の測定手法は、一つには、最小合計確率 (P(N)) であり、これは、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が偶然によって一致する確率の指標を与える。例えば、試験される核酸と PAK5 核酸との比較において最小合計確率が約 1 未満、好ましくは約 0.1 未満、より好ましくは約 0.01 未満、最も好ましくは約 0.001 未満ならば、核酸は PAK5 遺伝子または cDNA に類似すると考えられる。TBLAST は、NCBI によって GenBank のインターネットサイト (上掲) で提供されている BLAST の変異体であり、アミノ酸配列を核酸配列と比較するのに用いることができ、この場合には、GenBank の核酸データベースをすべてのリーディングフレームにおいて動的に翻訳してタンパク質検索配列と比較する。

【0093】

配列番号 3 で報告されるアミノ酸配列を検索配列として使用して TBLAST N で GenBank を探索した結果、PAK5 ポリペプチド (配列番号 3) の最初の 110 個のアミノ酸が人間の PAK4 の対応するドメインとおよそ 66% の同一性、83% の類似を示すことが明らかになった。配列中のこの伸長部は、GBD/CRIB ドメインモチーフであり、配列番号 3 の 11~53 の残基にほぼ相当する。GBD/CRIB モチーフは、RAC や Cdc42 と結合する他の多くのタンパク質と同様にすべての PAK で見つかり、タンパク質が GTP アーゼ

と相互作用するのに不可欠であることが示されている (Burbeio et al., J. Biol. Chem., vol. 270, 29071-29074, 1995)。PAK4のこの相同ドメインの他では、PAK5 (配列番号3のうちのほぼ110～449残基)の残るN末端ドメインは他の既知のタンパク質と有意な相同性を共有しない。しかし、新規なPAK5 (配列番号3のおよそ449～700残基)に予想される新規なキナーゼ触媒ドメインはPAKファミリーのキナーゼドメインと高度に類似しており、例えば、ヒトPAK4とはおよそ85%の同一性および92%の類似性、ヒトPAK4のキナーゼドメインとおよそ85%の同一性および92%の類似性、ヒトPAK3のキナーゼドメインとおよそ54%の同一性および76%の類似性、ヒトPAK1のキナーゼドメインとおよそ54%の同一性および75%の類似性、およびヒトPAK2のキナーゼドメインとおよそ53%の同一性および73%の類似性を有する。すべてのPAKファミリーと同様に、PAK5のキナーゼドメインは、セリン／トレオニンタンパク質キナーゼとして特徴的な11のサブドメインを含んでいる (キナーゼサブドメイン配列の分析用。例えば、Hanks, S. K. およびQuinn, A. M., Methods Enzymol. Vol 200, pp. 38-62; Hardie, G., Hanks, S. et al. The Protein Kinase Factsbook, Academic Press Inc; ISBN: 0123247195 参照)。例えば、PAK5の残基位置456-463 (GEGSTGIV) は、コンセンサスなキナーゼサブドメインIGxGxxGxVに対応する。サブドメインIIはリン酸転移ホストランスファー反応に関係し、トリペプチド配列AxKの中の不変リジンによって同定される。新規なキナーゼ配列番号3に関しては、サブドメインIIは、残基476-478 (AVK)で見つかる。サブドメインVIからIXは、多数の高度に保存された残基によって特定され、触媒活性の中核部を形成する。配列番号3は領域VIBを含み、これはコンセンサス配列HRDLxxxNを含む。配列番号3はこの領域でHRDIKSDS (ここでLeuに対するIleの、およびAsnに対するSerの置換は保存的である。) であるとともに、サブドメインVII中のAsp₅₈₆、Phe₅₈₇ およびGly₅₈₈ (これらはいずれもATP結合に関

係する。)は不変であるかほぼ不変である。サブドメインV I I中の保存されたD (A s p₅₈₆)はトランスファー用のA T Pの γ -リン酸塩を転移させるために機能する。配列番号3のサブドメインV I I Iは、高度に保存されたA P E配列(残基610-613)を含み、不変式G l u₆₁₃に対応するG l uを含む。サブドメインI Xの配列D x W S / A x G配列は配列番号3のアミノ酸位置625-630:3(D I W S L G)によって現される。この領域は大きな α -ヘリックスを形成し、コンセンサス配列の最初のA s pは、水素結合によって触媒ドメインのループを安定させる役目をする。

【0094】

したがって、本発明のP A K 5ポリペプチドの活性は、例えば、P A K 5のキナーゼ活性検定により決定することができる。このような検定法においては、上記のような組換え手段によって製造されたP A K 5ポリペプチドまたはその断片を、適当なリン酸塩供与体、好ましくは放射性同位体で同定されたリン酸塩を含むA T Pの存在下に、基質と接触させ、基質中への放射性同位体のP A K 5に依存した結合量が測定される。「基質」は、P A K 5による触媒作用が及ぼされる反応においてA T Pのようなドナー分子から転移された γ -リン酸基の受容体の役割をする適切な水酸基半分を含む任意の物質を意味する。基質は、P A K 5の内因性基質、すなわち、変異されていない細胞中、天然に存在するP A K 5によってリン酸化される天然に存在する物質、または、生理学的条件下ではP A K 5によって通常リン酸化されないが、使用される反応条件下ではP A K 5によってリン酸化され得る任意の物質でもよい。好ましくは、基質はタンパク質かペプチドであり、好ましくは、リン酸化反応は基質セリンかトレオニン残基に生じるものである。上記のようなキナーゼ検定では、非天然の基質が適切な基質となり得ることは当業者に周知であり、こうした検定法で広く用いられる基質の具体例には、ヒストンタンパク質およびミエリン塩基性タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。また、キナーゼ依存性基質リン酸化の検出は、放射性同位体で同定されたリン酸塩の基質への結合測定以外の多くの手段で達成できることは当業者に周知である。例えば、リン酸基の結合は、電気泳動における可動性、吸光度、蛍光および／または燐光、クロマトグラフィーの特性などの基質の物理化学

的な特性に影響し得る。基質のそのような物理化学的な特性の変化は、当業者には容易に測定可能であり、キナーゼ活性の指標として使用することができる。あるいは、基質のリン酸化された形式を選択的に認識する、モノクローナルまたはポリクローナルな抗体を生成できること、および、そのようにして、キナーゼ反応後の基質へのそうした抗体の結合の程度が、キナーゼ活性測定の間接法として使用できることも周知である。さらに、P A K キナーゼを含む多くのキナーゼが、同じキナーゼ分子上の残基へのリン酸化能を有することが知られている。そのようなリン酸化反応は自動リン酸化と名付けられ、したがって、その触媒作用によるP A K 5 自体の中へのリン酸塩の結合の測定を、P A K 5 活性の測定に用いてもよい。上記のキナーゼ検定法は、精製、または部分的に精製された組換えP A K 5 を用いて実行することができる、自然にタンパク質を発現する細胞から上記のような精製操作を使用して精製したP A K 5 を用いても行うことができる。

【0095】

さらに、P A K 5 活性はキナーゼ活性の検定によって測定されるだけでなく、完全な細胞、または細胞溶解物、またはシグナル伝達に関わる事象を *i n v i t r o* で再構成したシステムにおいて、P A K 5 活性につながるかその結果である事象の検知によって測定してもよい。例えば、P A K タンパク質がR a c とC d c 4 2 のようなG T P を結合力のあるタンパク質に結合し、これによって活性化されることは知られている。したがって、R a c / C d c 4 2 のような自然に存在するアクティベーターとの相互作用の検出、および／または基質を、P A K 5 活性の指標として用いてもよい。

【0096】

P A K 5 活性を調節することができる化合物を同定するために、試験化合物の存在下または不存在下で、検定法（例えば、上述したような検定法を含むが、これらに限定されるものではない）を行うことができる。

【0097】

酵素活性を調べるために他の分析法を使用することができる。こうしたものとしては、光度測定、放射能測定、H P L C、電気化学的その他の方法（例えば、*E n z y m e A s s a y s : A P r a c t i c a l A p p r o a c h*, R

. E i s e n t h a l および M . J . D a n s o n 編集, 1992, O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s 。これら参照によってその全体が本明細書に組み入れる)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0098】

本発明の好ましい実施形態では、PAK5 活性調節化合物用スクリーニング法は、化合物をPAK5と接触させ、化合物とPAK5との間の複合体の存在を検定することを含む。このような分析では、典型的にはPAK5は標識がされる。適宜インキュベート後に、遊離のPAK5を結合形から分離し、遊離しているか複合体形成していない標識量をもって特定の化合物のPAK5への結合能を測る。

【0099】

本発明の別の実施形態では、PAK5に対して適当な結合親和性を有する化合物のために高処理能スクリーニングが使用される。簡単に言えば、多くの小ペプチド試験化合物を固体基体上で合成する。ペプチド化合物はPAK5と接触した後洗浄される。その後、当業者に周知の方法で結合PAK5が検出される。

【0100】

本発明の精製されたポリペプチドも、前述の医薬スクリーニング技術で使用するプレート上に直接塗布することができる。さらに、非中和抗体がタンパク質の捕捉および固体支持体上への不動化に使用することができる。

【0101】

本発明の他の実施形態は、本発明のポリペプチドとの結合能力を有する中和化抗体を試験化合物とのポリペプチド結合に対する特異的に競争させる、競争的スクリーニング検定法の使用を含む。この方法では、抗体はPAK5と1つ以上の抗原決定要素を共有する任意のペプチドの存在を検出するために使用することができる。放射性同位体標識競争法の研究は、A . H . L i n e t a l . A n t i m i c r o b i a l A g e n t s a n d C h e m o t h e r a p y , 1997, v o l . 41, n o . 10, p p . 2127-2131に記載されており、その開示は参照によってその全体が本明細書に組み入れる。

【0102】

本発明の他の実施形態では、本発明のポリペプチドが、相互作用し調節するタンパク質の同定、特性記述および精製用の研究ツールとして使用される。適切な標識は当業者には公知の様々な方法によって発明のポリペプチドに結合される。また、ポリペプチドは対応分子を補足するために使用される。例えば、分子を標識ポリペプチドとともにインキュベートし、未結合のポリペプチドを除去のために洗浄し、ポリペプチド複合体量を計測する。異なる濃度のポリペプチドを使用して得られたデータを使用してタンパク質複合体を備えたポリペプチドの数、親和性および会合値を計算する。

【0103】

標識されたポリペプチドは、ポリペプチドが相互作用する分子（阻害剤が含まれるが、これに限定されない。）の精製用試薬として有用である。アフィニティー（親和性）精製の1つの実施形態では、ポリペプチドが、クロマトグラフィーカラムに共有結合でつながれる。細胞およびその細胞膜を抽出し、様々な細胞サブコンポーネントをカラムに通す。分子は、ポリペプチドへのその親和性によりカラムへ結合する。ポリペプチド複合体は分離され、カラムから回収され、回収された分子は、タンパク質配列決定にかけられる。その後、このアミノ酸配列は、捕捉分子を同定するため、または適切なcDNAライブラリーから対応遺伝子のクローニングをするため縮退オリゴヌクレオチドを設計するのに使用される。

【0104】

あるいは、本発明のPAK5に同様の特性を示す化合物を同定してもよいが、より小さく、ヒトまたは動物の身体中でPAK5より長い半減期を示す化合物を同定してもよい。有機化合物が設計される場合、本発明による分子は「リード」化合物として使用される。既知の薬剤として活性な化合物へのミメティックスの設計はそのような「リード」化合物に基づく医薬品開発でのよく知られたアプローチである。ミメティックスの設計、合成および試験は、一般に標的特性を得るために多くの分子をランダムスクリーニングを回避するために使用される。さらに、本発明のDNAによってコードされた、推定核酸配列の分析に由来する構造データは、より特異的、したがってより高い医薬的性能を有する新規薬剤を設計するのに有用である。

【0105】

上述したように、本発明のタンパク質配列をすべての利用可能なデータベース中にある配列と比較した結果、GBD/CRI Bドメインおよびセリン/トレオニンタンパク質キナーゼドメインとの顕著な相同性が示された。したがって、他のGBD/CRI Bまたはキナーゼドメインタンパク質の利用可能な情報に基づいて本発明のタンパク質の推定3次構造を開発するためにコンピューター・モデリングを使用することができる。このように、PAK5の推定構造に基づく新規な酵素抑制物質が設計されている。

【0106】

特定の実施形態では、本発明によるスクリーニング方法によって同定された新規な分子は、低分子量有機分子であり、この場合、錠剤のような経口摂取用のその組成物または医薬組成物を調製することができる。ここに記載するスクリーニング方法によって同定された核酸分子、ベクター、ポリペプチド、抗体および化合物を含む組成物、または医薬組成物は、任意の処方ルート用に調製することが可能であり、経口、静脈内、経皮、皮下、鼻内、筋肉内、腹腔内などのルートが含まれるが、これらに限定されない。担体その他の成分の性質は、特定の処方ルートおよび本発明に従い処方される際の特定制剤の実施形態に依存する。この意味において有用な技術およびプロトコルの例は、特にRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oso1, A(編), 1980に見出され、これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる。

【0107】

これらの低分子量化合物の投薬は、処置対象とする疾病状態または条件、および人または動物の体重その他の条件、および化合物の処方ルートのような他の臨床的要因に依存するであろう。ヒトまたは動物の処置のためには、体重当たりの化合物量がおおよそ0.5mg/kgから500mg/kgの間で処方できる。治療は典型的にはより低用量で処方され、所望の治療結果が観察されるまで継続される。

【0108】

本発明の化合物および方法は、核酸分子、ポリペプチド、抗体、ここに記載したスクリーニング方法によって同定された化合物を含め、様々な医薬用途があり、例えば、癌細胞および腫瘍成長のような無秩序な細胞成長を治療したり予防するために使用してもよい。特定の実施形態では、本発明の分子が遺伝子治療において使用される。遺伝子治療の方法の総説については、例えば、Anderson, Science, 1992, 256, 808-813 参照。これは参照によってその全体を本明細書に組み入れる。

【0109】

本発明による配列は表2に見られる通りである。

【0110】

表2

【0111】

【化1】

配列番号 1 pak5

```

1 gagaccggga acatggcgct gggagcncctg tagcagctga gaaggggctg aggcaccgcc
61 gcttcgctga cagccggcca ccagatgttc atgcattcta gagaaagtgg aaaacttaga
121 agcctaatta atgactgtct tctggacctc tgagaccatg tttctagtgt ttccgtgga
181 atattatcag aaatacactg tggtgaaatg cttccacctc ttgctaaaaa gaacactgag
241 gaaaaatgaa gaagactgac aagcaccagc gaaaagtgc agaatagaaa tagccacact
301 cctctggagt ctttaattca tccacagcca tcatataaag gttttggcat catgtttggg
361 aagaaaaaga aaaagattga aatatctggc ccgtccaact ttgaacacag ggttcatact
421 gggtttgatc cacaagagca gaagtttacc ggccttcccc agcagtggca cagcctgtta
481 gcagatacgg ccaacaggcc aaagcctatg gtggaccctt catgcatcac acccatccag
541 ctggctccta tgaagacaat cgttagagga aacaaacctc gcaaggaaac ctccatcaac
601 ggcctgctag aggattttga caacatctcg gtgactcgct ccaactccct aaggaaagaa
661 agcccaccca cccagatca gggagcctcc agccacggtc caggccacgc ggaagaaaaa
721 ggcttcatca ccttctccca gtattccagc gaatccgata ctactgctga ctacacgacc
781 gaaaagtaca gggagaagag tctctatgga gatgatctgg atccgtatta tagaggcagc
841 cacgcagcca agcaaaatgg gcacgtaatg aaaatgaagc acggggaggc ctactattct
901 gaggtgaagc ctttgaaatc cgattttgcc agattttctg ccgattatca ctcacatttg
961 gactcactga gcaaaccaag tgaatacagt gaacctcaagt gggagtatca gagagcctcg
1021 agtagctccc ctctggatta ttcattccaa ttcacacctt ctagaactgc agggaccagc
1081 ggggtgctca aggagagcct ggcgtacagt gaaagtgaat ggggaccagc cctggatgac
1141 tatgacagga ggccaaagtc ttcgtacctg aatcagacaa gccctcagcc caccatgcgg
1201 cagaggctca ggtcaggctc gggactccag gaaccgatga tgccatttgg agcaagtga
1261 tttaaaaccc atccccaagg acactcctac aactcctaca cctaccctcg cttgtccgag
1321 ccacaaatgt gcattccaaa ggtggattac gatcgagcac agatgggtct cagccctcca
1381 ctgtcagggt ctgacaccta cccagggggc cctgccaac tacctcaaaag tcaaagcaaa
1441 tcgggctatt cctcaagcag tcaccagtac ccgtctgggt accacaaagc caccttgtac
1501 catcacccct ccctgcagag cagttcgcag tacatctcca cggtctccta cctgagctcc
1561 ctcagcctct catccagcac ctaccgcccg ccagctggg gctcctcctc cgaccagcag
1621 cctccagggt tgteccatga acagtctcgg gcggccctgc agctgggtgt cagcccagga
1681 gaccccagggt aatacttggc caactttatc aaaatcgggg aaggctcaac cggcatcgta
1741 tgcatcgcca ccgagaaaca cacagggaac caagttgcag tgaagaaat ggacctccgg
1801 aagcaacaga gacgagaact gcttttcaat gaggtcgtga tcatgcgga ttaccaccat
1861 gacaatgtgg ttgacatgta cagcagctac cttgtcggcg atgagctctg ggtggtcatg
1921 gagtttctag aagggtgtgc cttgacagac attgtgactc acaccagaat gaatgaagaa
1981 cagatagcta ctgtctgcct gtcagttctg agagctctct cctaccttca taaccaagga
2041 gtgattcaca gggacataaa aagtgactcc atcctcctga caagcgatgg ccggataaag
2101 ttgtctgatt ttggtttctg tgctcaagtt tccaaagagg tgccgaagag gaaatcattg
2161 gttggcactc cctactggat ggcctctgag ctgatttcta ggctacctta tgggacagag
2221 gtggacatct ggtccctcgg gatcatggtg atagaaatga ttgatggcga gccccctac
2281 ttcaatgagc ctcccctcca ggcgatgcgg aggatccggg acagtttacc tccaagagtg
2341 aaggacctac acaaggttct ttcagtgtc cggggattec tagacttgat gttggtgagg
2401 gagccctctc agagagcaac agcccaggaa ctctcggac atccattctt aaaactagca
2461 ggtccaccgt cttgcatcgt cccctcatg agacaataca ggcactactg a

```

【 0 1 1 2 】

【 化 2 】

配列番号 2 pak5 ORF

```

1 atgttttggga agaaaaagaa aaagattgaa atatctggcc cgtccaactt tgaacacagg
61 gttcatactg ggtttgatcc acaagagcag aagtttaccg gccttcccca gcagtggcac
121 agcctgttag cagatacggc caacaggcca aagcctatgg tggacccttc atgcatcaca
181 cccatccagc tggctcctat gaagacaatc gttagaggaa acaaaccctg caaggaaacc
241 tccatcaacg gcctgctaga ggattttgac aacatctcgg tgactcgtc caactcccta
301 aggaaagaaa gccacccac cccagatcag ggagcctcca gccacggtec agggcaacgcg
361 gaagaaaatg gcttcatcac cttctccag tattccagcg aatccgatac tactgctgac
421 tacacgaccg aaaagtacag ggagaagagt ctctatggag atgactctga tccgtattat
481 agaggcagcc acgcagccaa gcaaatggg cactaatga aatgaagca cggggaggcc
541 tactattctg aggtgaagcc tttgaaatcc gattttgcc gattttctgc cgattatcac
601 tcacatttgg actcactgag caaaccaagt gaatacagt acctcaagt ggagtatcac
661 agagcctcga gtagctcccc tctggattat tcattccaat tcacacctc tagaactgca
721 gggaccagcg ggtgctccaa ggagagcctg gcgtacagt aaagtgaatg gggaccagc
781 ctggatgact atgacaggag gccaaagtct tcgtacctga atcagacaag ccctcagccc
841 accatgcggc agaggtccag gtcaggctcg ggactccagg aaccgatgat gccatttggg
901 gcaagtgcac ttaaaaccca tcccgaagg cactcctaca actcctcac ctaccctcgc
961 ttgtccgagc ccacaatgtg cattccaag gtggattacg atcgagcaca gatggtcttc
1021 agccctccac tgtcagggtc tgacacctac cccaggggcc ctgccaaact acctcaaagt
1081 caaagcaaat cgggctattc ctcaagcagt caccagtacc cgtctgggta ccacaaagcc
1141 accttgtacc atcacccctc cctgcagagc agttcgcagt acatctccac ggcttccctc
1201 ctgagctccc tcagcctctc atccagcacc taccgcccgc ccagctgggg ctcctcctcc
1261 gaccagcagc cctccagggg gtcccatgaa cagtctcggg cggccctgca gctggtggtc
1321 agcccaggag accccaggga atacttggcc aactttatca aaatcgggga aggctcaacc
1381 ggcacgttat gcacggcac cgagaaacac acagggaaac aagttgcagt gaagaaaatg
1441 gacctccgga agcaacagag acgagaactg cttttcaatg aggtcgtgat catgctggat
1501 taccaccatg acaatgtggt tgacatgtac agcagctacc ttgtcggcga tgagctctgg
1561 gtggtcatgg agtttctaga aggtggtgcc ttgacagaca ttgtgactca caccagaatg
1621 aatgaagaac agatagctac tgtctgcctg tcagttctga gagctctctc ctaccttcac
1681 aaccaaggag tgattcacag ggacataaaa agtgactcca tcctcctgac aagcgatggc
1741 cggataaagt tgtctgattt tggtttctgt gctcaagttt ccaagagggt gccgaagagg
1801 aaatcattgg ttggcactcc ctactggatg gccctcagc tgattttctag gctaccttat
1861 gggacagagg tggacatctg gtccctcggg atcatggtga tagaaatgat tgatggcgag
1921 cccccctact tcaatgagcc tcccctccag gcgatgcgga ggatccggga cagtttacct
1981 ccaagagtga aggacctaca caaggtttct tcagtgcctc ggggattcct agacttgatg
2041 ttggtgaggg agccctctca gagagcaaca gcccaggaaac tcctcggaca tccattctta
2101 aaactagcag gtccaccgtc ttgcatcgtc cccctcatga gacaatacag gcatcac

```

【 0 1 1 3 】

【 化 3 】

配列番号 3 PAK5 アミノ酸配列

```

1  MFGKKKKKIE ISGPSNFEHR VHTGFDPQEQ KFTGLPQQWH SLLADTANRP KPMVDPSCIT
61  PIQLAPMKTI VRGNKPKKET SINGLEDFD NISVTRSNSL RKESPTPDQ GASSHGPGHA
121 EENGFITFSQ YSSESITAD YTEKYREKS LYGDLDPPY RGSAAKQNG HVMKMKHGEA
181 YYSEVKPLKS DFARFSADYH SHLDSLSKPS EYSDLKWEYQ RASSSSPLDY SFQFTPSRTA
241 GTSGCSKESL AYSESEWGPS LDDYDRRPS SYLNQTSPPQ TMRQRSRSGS GLQEPMPFPG
301 ASAFKTHPQG HSYNSYTYPR LSEPTMCIPK VDYDRAQMV LSPPLSGSDTY PRGPAKL PQS
361 QSKSGYSSSS HQYPSGYHKA TLYHHPSLQS SSQYISTASY LSSLSLSSST YPPPSWGSSS
421 DQPSRVSHE QFRAALQLVV SPGDPREYLA NFIKIGEGST GIVCIGTEKH TGKQVAVKKM
481 DLRRQQRREL LFNEVIMRD YHHDNVVDMY SSYLVGDELW VMEFLEGGA LFDIVTHTRM
541 NEEQIATVCL SVLRALSYLH NQGVHRDIK SDSILLTSDG RIKLSDFGFC AQVSKEVPKR
601 KSLVGTPYWM APELISRLPY GTEVDIWSLG IMVIEMIDGE PPYFNEPPLQ AMRRIRDSL P
661 PRVLDLHKVS SVLRGFLDLM LVREPSQRAT AQELLGHPFL KLAGPPSCIV PLMRQYRHH

```

【 0 1 1 4 】

【 化 4 】

配列番号 4 GenBankからのヒトPAK1CDS

```

1  atgtcaata acggcctaga cattcaagac aaacccccag cccctccgat gagaaatacc
61  agcactatga ttggagccgg cagcaaagat gctggaaccc taaaccatgg ttctaaacct
121 ctgcctccaa acccagagga gaagaaaaag aaggaccgat ttaccgatc cattttacct
181 ggagataaaa caataaaaa gaaagagaaa gagcggccag agatttctct ccttcagat
241 tttgaacaca caattcatgt cggttttgat gctgtcacag gggagtttac cggaatgcc
301 gagcagtggt cccgcttgct tcagacatca aatatcacta agtcggagca gaagaaaaac
361 ccgcaggctg ttctggatgt gttggagttt tacaactcga agaagacatc caacagccag
421 aaatacatga gctttacaga taagtcagct gaggattaca attcttctaa tgccttgaat
481 gtgaaggctg tgtctgagac tcctgcagtg ccaccagttt cagaagatga ggtgatgat
541 gatgatgatg ctacccacc accagtgatt gctccacgcc cagagcacac aaaatctgta
601 tacacacggt ctgtgattga accacttcct gtcactccaa ctggggacgt ggctacatct
661 cccatttcac ctactgaaa taacaccact ccaccagatg ctttgacct taatactgag
721 aagcagaaga agaagcctaa aatgtctgat gaggagatct tggagaaatt acgaagcata
781 gtgagtgtgg gcgacccata gaagaaatat acacggtttg agaagattgg acaagggtct
841 tcaggcaccg tgtacacagc aatggatgtg gccacaggac aggaggtggc cattaagcag
901 atgaatcttc agcagcagcc caagaaagag ctgattatta atgagatcct ggtcatgagg
961 gaaaacaaga acccaaacat tgtgaattac ttggacagtt acctcgtggg agatgagctg
1021 tgggttggtt tggaaatact ggctggaggc tccttgacag atgtggtgac agaaacttgc
1081 atggatgaag gccaaattgc agctgtgtgc cgtgagtgtc tgcaggctct ggagtctttg
1141 cattcgaacc aggtcattca cagagacatc aagagtgaac atattctgtt gggaaatggat
1201 ggctctgtca agctaactga ctttggattc tgtgcacaga taacccaga gcagagcaaa
1261 cggagcacca tggtaggaac ccataactg atggcaccag aggttggtgac acgaaaggcc
1321 tatgggcccc aggttgacat ctggtccctg ggcacatgag ccacgaaat gattgaaggg
1381 gagcctccat acctcaatga aaacctctg agagccttgt acctcattgc caccaatggg
1441 accccagaac ttcagaaccc agagaagctg tcagctatct tccgggactt tctgaaccgc
1501 tgtctcgaga tggatgtgga gaagagaggt tcagctaaag agctgtaca gcacaaatc
1561 ctgaagattg ccaagccctc ctccagcctc actccactga ttgctgcagc taaggaggca
1621 acaagaaca atcactaa

```

【 0 1 1 5 】

【 化 5 】

配列番号5 GenBankからのヒトPAK2CDS

```

1  atgtctgata acggagaact ggaagataag cctccagcac ctctgtgctg aatgagcagc
61  accatcttta gcactggagg caaagaccct ttgtcagcca atcacagttt gaaacctttg
121  ccctctgttc cagaagagaa aaagcccagg cataaaatca tctccatatt ctcaggcaca
181  gagaaaggaa gtaaaaagaa agaaaaggaa cggccagaaa ttctctctcc atctgatttt
241  gagcacacca tccatgttgg ctttgatgct gttactggag aattcactgg catgccagaa
301  cagtgggctc gattactaca gacctccaat atcaccaaac tagagcaaaa gaagaatcct
361  caggctgtgc tggatgtcct aaagttctac gactccaaca cagtgaagca gaaatatctg
421  agctttactc ctctcgagaa agatggcctt ccttctggaa cggcagcact gaatgccaa
481  ggaacagaag ccccgcagc agtgacagag gaggaggatg atgatgaaga gactgtcct
541  cccgttattg ccccgcgacc ggatcatacg aaatcaattt acacacggtc tghtaattgac
601  cctgttctcg caccagttgg tgattcacat gttgatggtg ctgccaaagt tttagacaaa
661  cagaaaaaga agcctaagat gacagatgaa gagattatgg agaaattaag aactatcgtg
721  agcatagggtg accctaagaa aaaatataca agatatgaaa aaattggaca aggggcttct
781  ggtacagttt tcactgctac tgacgttgca ctgggacagg aggttgctat caaacaattt
841  aatttacaga aacagccaaa gaaggaactg atcattaacg agattctggt gatgaaagaa
901  ttgaaaaatc ccaacatcgt taactttttg gacagttacc tggtaggaga tgaattgttt
961  gtggtcatgg aataccttgc tgggggggtc ctactgatg tggtaacaga aacagcttgc
1021  atggatgaag cacagattgc tgctgtatgc agagagtgtt tacaggcatt ggagttttta
1081  catgctaata aagtgatcca cagagacatc aaaagtgaca atgtactttt gggaatggaa
1141  ggatctgtta agctcactga ctttggtttc tgtgccaga tcaccttga gcagagcaaa
1201  cgcagtacca tggtcggaac gccatactgg atggcaccag aggtggttac acggaaagct
1261  tatggcccta aagtcgacat atggctctcg ggtatcatgg ctattgagat ggtagaagga
1321  gagcctccat acctcaatga aaatcccttg agggccttgt acctaatagc aactaatgga
1381  accccagAAC ttcagaatcc agagaaactt tccccaatat ttcgggattt cttaaatcga
1441  tgtttggaat tggatgtgga aaaaaggggt tcagccaaag aattattaca gcatccttcc
1501  ctgaaactgg ccaaaccgtt atctagcttg acaccactga tcatggcagc taaagaagca
1561  atgaagagta accgttaa

```

【 0 1 1 6 】

【 化 6 】

配列番号6 GenBankからのヒトPAK3CDS

```

1  atgtctgacg gtctggataa tgaagagaaa cccccggctc ctccactgag gatgaatagt
61  aacaaccggg attcttcagc actcaaccac agctccaaac cacttcccat ggcccctgaa
121  gagaagaata agaaagccag gcttcgctct atcttcccag gaggagggga taaaaccaat
181  aagaagaagg agaaagagcg cccagagatc tctcttctt cagactttga gcatacgatt
241  catgtggggt ttgatgcagt caccggggaa ttcactgga ttccagagca atgggcacga
301  ttactccaaa cttccaacat aacaaaattg gaacagaaga agaaccaca agctgttcta
361  gatgtttcta aattctatga ttccaaagaa acagtcaaca accagaaata catgagcttt
421  acatcaggag ataaaagtgc acatggatag atagcagccc atccttcgag tacaaaaaca
481  gcatctgagc ctccattggc ccctcctgtg tctgaagaag aagatgaaga ggaagaagaa
541  gaagaagatg aaaatgagcc accaccagtt atcgcaccaa gaccagagca tacaaaatca
601  atctatactc gttctgtggt tgaatccatt gcttcaccag cagtaccaa taaagaggtc
661  acaccacctt ctgctgaaaa tgccaattcc agtactttgt acaggaacac agatcggcaa
721  agaaaaaaat ccaagatgac agatgaggag atcttagaga agctaagaag cattgtgagt
781  gttggggacc caaagaaaaa atacacaaga ttgaaaaaa ttggtcaagg ggcatcaggt
841  actgtttata cagcactaga cattgcaaca ggacaagagg tggccataaa gcagatgaac
901  ctccaacagc aaccaagaa ggaattaatt attaatgaaa ttctgggtcat gagggaatat
961  aagaacccta atattgttaa ttatttagat agctacttgg tgggtgatga actatgggta
1021  gtcattggaat acttggctgg tggctctctg actgatgtgg tcacagagac ctgtatggat
1081  gaaggacaga tagcagctgt ctgcagagag tgcctgcaag ctttggattt cctgcactca
1141  aaccagggtga tccatagaga tataaagagt gacaatatcc ttctcgggat ggatggctct
1201  gttaaattga ctgactttgg gttctgtgcc cagatcactc ctgagcaaag taaacgaagc
1261  actatgggtg gaaccccata ttggatggca cctgagggtg tgactcgaaa agcttatggt
1321  ccgaaagtgt atatctggtc tcttgggaatt atggcaattg aaatgggtga aggtgaaccc
1381  ccttacctta atgaaaatcc actcagggca ttgtatctga tagccactaa tggaaactca
1441  gagctccaga atcctgagag actgtcagct gtattccgtg actttttaaa tcgctgtctt
1501  gagatggatg tggataggcg aggatctgcc aaggagcttt tgcagcatcc atttttaaaa
1561  ttageccaagc ctctctccag cctgactcct ctgattatcg ctgcaaagga agcaattaag
1621  aacagcagcc gctaa

```

【 0 1 1 7 】

【 化 7 】

配列番号7 GenBankからのヒトPAK4CDS

```

1  atgtttggga agaggaagaa gcgggtggag atctccgcgc cgtccaactt cgagcaccgc
61  gtgcacacgg gcttcgacca gcacgagcag aagtccacgg ggctgccccg ccagtggcag
121 agcctgatcg aggagtgggc tcgccggccc aagccctcgc tcgacccccg ctgcatcacc
181 tccatccagc ccggggcccc caagaccatc gtgcggggca gcaaagggtg caaagatggg
241 gccctcacgc tgctgctgga cgagtttgag aacatgtcgg tgacacgctc caactccctg
301 cggagagaca gcccgccgcc gcccgccgt gcccgccagg aaaatgggat gccagaggag
361 ccggccacca ccggccaggg ggcccaggg aaggcaggca gccgaggccg gttcgcgggt
421 cacagcagg caggtggcgg cagtggtag aggcgacggg cggggccaga gaagagcccc
481 aagtcttcca gggagggtc aggggtccc caggagtctt cccgggacaa acgccccctc
541 tccgggctcg atgtggcac ccccagcct gctgggtctg ccagtggggc gaaactggca
601 gctggccggc cctttaacac ctaccgagg gctgacacgg accaccctc ccgggggtgc
661 cagggggagc ctcatgacgt gggccctaac gggccatcag cggggggcct ggccatcccc
721 cagtctctct cctctctct cgggctccc acccgagccc gaggtgcccc cagccctgga
781 gtgctgggac cccacgcctc agagccccag ctggccctc cagctgcac ccccgccgcc
841 cctgctgttc ctgggcccc tgccccccg tcaccacagc gggagccaca gcgagtatcc
901 catgagcagt tccgggctgc cctgcagctg gtggtggacc caggcgaccc ccgctctac
961 ctggacaact tcataagat tggcgagggc tcacgggca tcgtgtgcat cgccaccgtg
1021 cgcagctcgg gcaagctggt gcccgctcaag aagatggacc tgcgcaagca gcagaggcgc
1081 gagctgctct tcaacgaggt ggtaatcatg agggactacc agcacgagaa tgtggtggag
1141 atgtacaaca gctacctggt gggggacgag ctctgggtgg tcatggagtt cctggaagga
1201 ggcgccctca ccgacatcgt caccacacc aggatgaacg aggagcagat cgcagccgtg
1261 tgccttgca gctgcaggc cctgtcgggt ctccacgccc agggcgctcat ccaccgggac
1321 atcaagagcg actcgatcct gctgacccat gatggcaggg tgaagctgtc agactttggg
1381 ttctgcgccc aggtgagcaa ggaagtgcgc cgaagggaag cgctggtcgg cacgccctac
1441 tggatggccc cagagctcat ctccgcctt ccctacgggc cagaggtaga catctggtcg
1501 ctggggataa tgggtgattga gatggtggac ggagagcccc cctacttcaa cgagccaccc
1561 ctcaaagcca tgaagatgat tcgggacaac ctgccacccc gactgaagaa cctgcacaag
1621 gtgtgcgcat ccctgaaggg cttcctggac cgcttgcctg tgcgagaccc tgcccagcgg
1681 gccacggcag ccgagctgct gaagcaccca ttctggcca aggcaggggc gcctgccagc
1741 atcgtgcccc tcatgcgcca gaaccgcacc agatga

```

【 0 1 1 8 】

【 化 8 】

配列番号8 Incyte テンプレート 067594.1

```

1  gagaccggga acatggcgct gggagcncctg tagcagctga gaaggggctg aggcaccgcc
61  gcttcgctga cagccggcca ccagatgttc atgcattcta gaaaaagtgg aaaacttaga
121 agcctaatta atgactgtct tctggacctc tgagaccatg tttctagtgt tttccgtgga
181 atattatcag aaatacactg tggtgaaatg cttccacctc ttgctaaaaat gaacactgag
241 gaaaaatgaa gaagactgac aagcaccagc gaaaagtgtc agaatagaaa tagccacact
301 cctctggagt ctttaattca tcacagcca tcataataag gttttggcat catgtttggg
361 aagaaaaaga aaaagattga aatatctggc ccgtccaact ttgaacacag ggttcatact
421 gggtttgatc cacaagagca gaagtttacc ggcttcccc agcagtggca cagcctgtta
481 gcagatacgg ccaacaggcc aaagcctatg gtggaccctt catgcatcac acccatccag
541 ctggctccta tgaagacatc gttagaggaa acaaaccctg c

```

【 0 1 1 9 】

【 化 9 】

配列番号 9 = gcatcatgtt tgggaagaaa -プライマー配列

【 0 1 2 0 】

【 化 1 0 】

配列番号 10 = a(g/c)ctc(a/t)gg(t/g)g ccatcca(g/a)ta -プライマー配列

【 0 1 2 1 】

【 化 1 1 】

配列番号 11 = 最初の PCR からの挿入配列

```
1  gcatcatgtt tgggaagaaa aagaaaaaga ttgaaatatt tggcccgtcc aactttgaac
61  acagggttca tactgggttt gatccacaag agcagaagtt taccggcctt ccccgagcgt
121 ggcacagcct gttagcagat acggccaaca ggccaaagcc tatggtggac ccttcatgca
181 tcacacccat ccagctggct cctatgaaga caatcgttag aggaaacaaa ccttgcaagg
241 aaacctccat caacggcctg ctgaggatt ttgacaacat ctcggtgact cgctccaact
301 ccctaaggaa agaaagccca cccacccag atcaggggagc ctccagccac ggtccaggcc
361 acgcggaaga aaatggcttc atcaccttct cccagtattc cagcgaatcc gatactactg
421 ctgactacac gaccgaaaag tacagggaga agagtctcta tggagatgat ctggatccgt
481 attatagagg cagccacgca gccaaagcaa atgggcacgt aatgaaaatg aagcacgggg
541 aggcctacta ttctgaggtg aagcctttga aatccgattt tggcagattt tctgccgatt
601 atcacacaca ttggactca ctgagcaaac caagtgaata cagtgaacct aagtgggagt
661 atcagagagc ctcgagtagc tccctcttgg attattcatt ccaattcaca cctctagaa
721 ctgcagggac cagcgggtgc tccaaggaga gcctggcgta cagtgaagt gaatggggac
781 ccagcctgga tgactatgac aggaggccaa agtcttcgta cctgaatcag acaagccctc
841 agcccacat gcggcagagg tccaggtcag gctcgggact ccaggaaccg atgatgccat
901 ttggagcaag tgcatttaaa acccatcccc aaggacactc ctacaactcc tacacctacc
961 ctgccttgtc cgagcccaca atgtgcatte caaagggtga ttacgatcga gcacagatgg
1021 tccctagccc tccactgtca gggctctgaca cctaccccag gggccctgcc aaactacctc
1081 aaagtcaaag caaatcgggc tattctctca gcagtcacca gtaccctctt gggtagccca
1141 aagccacctt gtaccatcac ccctccctgc agagcagttc gcagtacatc tccacggctt
1201 cctacctgag ctccctcagc ctctcatcca gcacctacc gccgcccagc tggggctcct
1261 cctccgacca gcagccctcc aggggtgtccc atgaacagtt tcgggaggcc ctgcagctgg
1321 tggtcagccc aggagacccc agggaatact tggccaactt tatcaaaatc ggggaaggct
1381 caaccggcat cgtatgcac gccaccgaga aacacacagg gaaacaagtt gcagtgaaga
1441 aaatggacct ccggaagcaa cagagacgag aactgctttt caatgaggtc gtgatcatgc
1501 gggattacca ccatgacaat gtggttgaca tgtacagcag ctaccttgtc ggcgatgagc
1561 tctgggtggt catggagttt ctagaagggt gtgccttgac agacattgtg actcacacca
1621 gaatgaatga agaacagata gctactgtct gcctgtcagt tctgagagct ctctcctacc
1681 ttcataacca aggagtgtt caccgggaca taaaaagtga ctccatctc ctgacaagcg
1741 atggccggat aaagtgtct gattttgggt tctgtgtcga agtttccaaa gaggtgccga
1801 agaggaaatc attggttggc actccctact ggatggcccc tgagct
```

【 0 1 2 2 】

【 化 1 2 】

配列番号12 GenBank受託番号AL031652内の配列から導出

```
1  ataaagttgt ctgatttttg tttctgtgct caagtttcca aagaggtgcc gaagaggaaa
61  tcattggttg gcactcccta ctggatggcc cctgaggtga tttctagget accttatggg
121 acagaggtgg acatctggtc cctcgggatc atggtgatag aaatgattga tggcgagccc
181 ccctacttca atgagcctcc cctccaggcg atgaggagga tccgggacag ttacctcca
241 agagtgaagg acctacacaa ggtttcttca gtgctccggg gattcctaga ctgagtgtg
301 gtgagggagc cctctcagag agcaacagcc caggaactcc tcggacatcc attcttaaaa
361 ctgacaggtc caccgtcttg catcgtcccc ctcatgagac aatacaggca tcactga
```

【 0 1 2 3 】

【 化 1 3 】

配列番号13 = gagaccggga acatggcgct -プライマー配列 (センス)

【 0 1 2 4 】

【 化 1 4 】

配列番号14 = tcagtgatgc ctgtattgtc tc -プライマー配列 (アンチセンス)

【 0 1 2 5 】

本発明をより明示することを意図した以下の実施例によって、本発明をさらに説明する。これらの実施例は本発明の範囲を限定する意図ではないし、そのように理解してはならない。本発明は、特にここに記載した以外にも実施可能であることは明らかであろう。本発明の多数の修飾は、ここでの教示を参照すれば可能あり、したがって、本発明の範囲内である。

【 0 1 2 6 】

下に示された実施例1～3および6～7は実際の例である、一方、実施例4、5および8～10は予測例である。

【 0 1 2 7 】

添付図面において、

図1：293繊維芽細胞の溶解物から免疫的に精製されたPAK5に対するキナーゼ検定であり、このキナーゼが全般的な基質をリン酸化することができることを示している。

【 0 1 2 8 】

1Aは、基質としてヒストン・ミエリン塩基性タンパク質(MBP)を用いて

実行したキナーゼ検定。方法は実施例 3 に記載する。レーン 1 とレーン 2 は、P A K 5 をコードするベクターに細胞導入した細胞からの免疫的沈殿物に対応する。レーン 3 およびレーン 4 は空の対照ベクターに細胞導入した細胞からの免疫的沈殿物に対応する。レーン 1 とレーン 3 では M B P がキナーゼ反応中に存在するが、レーン 2 とレーン 4 では M B P は存在しない。図の左手横の棒は分子量マーカーのおよその位置を示し、そのサイズは上から下に 1 0 0、8 0、5 0、3 5、および 2 8 k D a であった。M B P が存在する状態で、P A K 5 が強い自動リン酸化を示すことに注意されたい。

【 0 1 2 9 】

1 B. 基質としてヒストン H 1 を用いて実行したキナーゼ検定。レーン 1 とレーン 2 は、P A K 5 をコードするベクターに細胞導入した細胞からの免疫的沈殿物に対応する。レーン 3 およびレーン 4 は空の対照ベクターに細胞導入した細胞からの免疫的沈殿物に対応する。レーン 1 とレーン 3 ではヒストン H 1 が存在するが、レーン 2 とレーン 4 ではヒストン H 1 は存在しない。図の左手横の棒は分子量マーカーのおよその位置を示し、そのサイズは上から下に 1 2 0、8 0、5 0、3 5、2 7、2 0 および 7 k D a であった。

【 0 1 3 0 】

図 2：正常な人体組織中の P a k 5 m R N A の分布を示す多組織のノーザンブロット

2 A. いくつかの組織系 (C l o n t e c h h u m a n m u l t i p l e t i s s u e b l o t # 7 7 6 0 - 1) での分析は、P A K 5 (上段) が脳内で選択的に発現されることを示す。対照として下段にはアクチンプローブによるブロットを示す。

【 0 1 3 1 】

2 B. 正常なヒト脳の部分領域のノーザン分析をレーンに示すが、いくつかの領域で強い発現を示す。上段は C l o n t e c h h u m a n B r a i n b l o t I I, # 7 7 5 5 - 1 に、下段は C l o n t e c h h u m a n B r a i n b l o t I V, # 7 7 6 9 - 1 に対応する。

【 0 1 3 2 】

実施例

実施例 1 : PAK5 の同定

4種の既知のヒトPAK配列 (PAK1~4 ; それぞれ配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7) を GenBank データベースから抽出した。配列を翻訳およびアラインメントし、キナーゼドメインはアラインメントから除いて、残った非キナーゼアラインメントを、WiseToolsソフトウェア (Birney et al., Nucleic Acids Res 24, 2730-2739, 1996) を使用して、隠れマルコフモデル (HMM) プロファイル生成への入力として用いた。得られたHMMをIncyte ESTデータベース検索のために使用した。この検索により、ヌクレオチド残基が352-581である581bpの未知の部分配列 (Incyte テンプレート067594.1 (配列番号8)) は、PAK-4 CDSの最初の230ヌクレオチド (つまり、配列番号7の残基1-230) と顕著な相同性を示した。我々はこのようにして配列番号8がPAKファミリーの新規なメンバーへの部分的なcDNAクローンを表し、5' UTRの351塩基に対応し、配列の最初の230塩基を加えた、位置231-233でのORFの開始コドン具备了たものを表しているとの仮説を立てた。この位置のATGは、タンパク質翻訳開始のためのKozakコンセンサス配列の一部をなす (Kozak M, Cell vol. 44: 283-92, 1986)。この新規な配列をPAK4への相同性に基づきPAK5と呼んだ。

【0133】

実施例 2 : pak5 cDNA のクローニング

配列番号8の位置347-366に特異的に一致し、推測されるCDSの5'のごく近傍において、PAK5を特異的に増幅するが、他の既知のPAKファミリー配列の増幅はしないセンスPCRプライマー (配列番号9) が設計された。推測されるCDSの3' 付近のアンチプライマーは、VECTOR NTI Suiteソフトウェア (Informax, Inc., Bethesda ND) 内のアラインプログラムを用い、目視で、推定上のPAK5配列を増幅するための適当な縮退プライマー (配列番号10) を選択することにより、すべてのP

AKタンパク質ファミリーの3'領域における保存されたキナーゼドメインをアラインさせて設計された。このプライマーはヒトPAK-4配列(配列番号7)の位置1438-1457のアンチセンス配列に対して最も高い相同性を示す。このように、配列番号9と配列番号10とによって定義されたプライマー対は、適当なPCR条件の下、および適当なテンプレートcDNAを用いれば、新規キナーゼをコードする配列の大部分をコードするcDNA断片を特異的に増幅するはずである。MJ Research PTC-225 PCR cyclerを下記の条件: 96℃15秒間、54℃15秒間、72℃2分間で30サイクル用いた。ヒト胎児脳mRNA (Clontech)の逆転写により得られたcDNAをPCR反応における鋳型に用いた。得られたPCR産物をキットのプロトコルによりTAクローニング法によりpCR2.1 "TA" vector (Invitrogen)にサブクローニングした。得られた連結反応物を用いてIN VαF'大腸菌(E. coli)コンピテント細胞(Invitrogen)を形質転換した。選択培地(LB 肉汁, アンピシリン)において単独の単離された大腸菌クローンを37℃で一昼夜生育し、プラスミドDNA (Qiagen Plasmid DNA preparation kit)の調製に使用した。

【0134】

2種の独立クローンのインサートを、ABI377蛍光ベースシーケンサー(Perkin Elmer/Applied Biosystems Division, PE/ABD, Foster City, CA)およびTaqFSポリメラーゼを備えたABI PRISM Ready Dye-Deoxyターミネーター・キットを直接使用して配列決定した。各ABIサイクルの配列決定反応は約0.5μgのプラスミドDNAを含む。サイクル配列は98℃一分間初期変性を行い、次いで98℃30秒の変性、50℃30秒のアニーリング、そして60℃4分間の伸長を50サイクルで配列決定サイクルを行った。温度サイクルおよび回数はPerkin-Elmer社9600サーモサイクラー(thermocycler)によって制御した。伸長生成物は、Centriflexゲルろ過カラム(Advanced Genetic Techno

logies Corp., Gaithersburg, MD) を用いて精製した。各反応物をピペットでカラム上に置き、これを室温で4分間の $1500 \times g$ 、揺動バケツ状遠心分離機 (Sorvall model RT6000B 卓上遠心分離機) で遠心分離した。カラム内の精製試料を、約40分間真空乾燥し、次いで溶解して $5 \mu l$ のDNAロード用溶液 (83% 脱イオンホルムアミド、8.3 mM EDTA および 1.6 mg/ml Blue Dextran) とした。その後、試料を 90°C まで3分間加熱し、配列分析を行うためにゲル試料ウェルにロードした。配列分析は、Sequencher プログラム (Gene Codes, Ann Arbor, MI) にABI 377 ファイルを取り込み実行した。概ね700 bp の配列が読み取れた。考え得る配列決定上のエラーを最少にするため、両方のDNA鎖から配列情報を得、さらに、難しい領域については異なる場所にプライマーを用いて再度配列決定を行ってあいまいな配列をすべて除いた。得られた配列を配列番号11として報告する。配列番号11をGenBank データベースに対する検索配列として使用した。このデータベースではギャップド (Gapped) BLAST を使用して、類似領域を求め探索を行った。この結果、検索配列に対して統計的に有意な重複相同性を持って、GenBank 寄託番号 (ACCESSION #) AL031652 なる鋳型配列が同定された。テンプレート GenBank ACCESSION # AL031652 によって同定された配列は、無関係な配列の他に、推定PAK1様キナーゼの停止コドン (配列番号12) を含む、3' の417 残基をコードすると推定されるcDNAを含んでいる。配列番号11の残基1749~1846 から拡張された重複類似性を、鋳型 (配列番号12) の残基1~98 と比較し、全DNA配列同一性98.98%までアラインした。配列番号11は、したがって、公開された配列番号12には存在しない、5' から重複部に至るまでの配列1748 bp を含み、一方、配列番号12は、配列番号11には存在しない3' から重複部に至るまでの配列319 bp を含んでいた。この情報を総合すると、配列番号8に含まれる部分コード配列 (つまり、Incytetemplate 067594.1)、PCR クローニング/配列決定により導かれた配列番号11、およびゲノムのクローンAL031652 から「PAK1様セリントレオニンキナーゼ

」を部分的にコードする配列が推定された配列番号12を組み合わせることによりPAK5全長の配列を推定することが可能であった。配列番号11（これはPAK5配列の大部分を含み、従来未知であった。）のPCRクローニングおよび配列決定を行わずに、キナーゼの触媒ドメインの大部分を含め、配列番号8と配列番号12を同じ遺伝子に帰属させることは不可能であったであろう。さらに、配列番号12は発現配列ではないが、多数の中間部分の非コード配列（イントロン）を有することがゲノムDNAから推定され、既存の情報では、配列番号12が実際に、そういうものとして発現されると推論することは不可能であったであろう。配列番号11の配列を配列番号8（つまりIncYTE 鋳型067594.1）内に含まれる非重複配列配列番号12内に含まれるもの（つまり、ゲノムクローンGenBank Accession AL031652からの推定部分コード配列）によって組み立てられれば、配列番号1で示される全長配列が得られる。

【0135】

配列番号8、配列番号11および配列番号12が、実際に、同じ遺伝子の近接する伸長部を表わすことを正式に示すため、配列番号13に関して述べたセンスプライマーと配列番号14に関して述べたアンチセンスのプライマー（これらはそれぞれ配列番号1の配列の5'（センス）と3'（アンチセンス）端部をカバーする。）を用い、PCRによって胎児の脳cDNAから十分な大きさのPAK5を増幅した。独立したPCR反応からいくつかの独立したクローンを配列決定し、配列番号1のヌクレオチド残基に対応する予測断片を含むことが見出された。この配列は、開始ATGコドンにおいてKozakコンセンサス配列を含む2157bp（配列番号2）の主要なオープンリーディングフレーム（ORF）を含んでいる。ORFの翻訳から、既知のPAK 1～4と相同性を有する719個のアミノ酸タンパク質配列（配列番号3）が得られ、これは、特にセリン／トレオニンタンパク質キナーゼ（上に議論された）のPAKファミリーで見つかった保存されたGBD／CRIB領域、およびキナーゼサブドメインを含んでいる。PAK5タンパク質は予測分子量80759.01ドルトン、7.72の等電点およびpH7.0で3.09の純変化を有する。

【0136】

実施例3：PAK5キナーゼ活性レベルを同定する検定

ヒト293細胞に、実施例7に述べるPAK5全長をコードする哺乳類の発現ベクターp cDNA3.1 (Invitrogen)、または対照(空ベクター)を細胞導入し、24時間後に哺乳類細胞溶解バッファーM-Per (Pierce)を使用して溶解させた。500 μ gの溶解した細胞タンパク質を最終体積500 mlとなるようにM-Perバッファーで希釈し、この溶解物をタンパク質A Sepharose (Sigma Chemical Company) およびポリクローナル抗PAK5抗血清20 μ lと混合することにより免疫沈殿させた。反応は4℃で2時間行い、その後に、免疫沈殿を含むタンパク質A-sepharoseペレットを遠心分離 (10,000 \times g、5分) によって500 μ l M-Perバッファーで2度、修飾キナーゼ反応バッファー500 μ l (20 mM HEPES (pH 7.5)、10 mM 酢酸マグネシウム、1 mM DDT、0.01 mM オルトバナジン酸ナトリウムを含む。) で2度洗浄した。洗浄後、10 μ l タンパク質A-sepharoseペレットを過剰バッファーで排出し、下記の通りキナーゼ反応に用いた。

【0137】

免疫沈殿のために使用された抗PAK5抗血清は、配列番号3のPAK5配列残基106～404に対応するPAK5断片に融合させたGSTを含む組換え融合タンパク質でウサギ(NZW, Charles River)を免疫することにより生成した。ウサギの免疫および抗血清の製造は、Using Antibodies: A Laboratory Manual by Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN: 0879695439の記載に従って行った。

【0138】

上記で得た免疫沈殿物を含む最終体積10 μ lのタンパク質A-sepharoseペレットを20 μ gのミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、または10 μ lの3 \times キナーゼ反応バッファー(KRB) (次のものを含む: 60 mM

HEPES (pH 7.5)、30 mM 酢酸マグネシウム、0.15 mM ATP、3 mM DTT、0.03 mM オルトバナジン酸ナトリウム) に溶かした 20 μ g ヒストン (H1) と混合した。5 μ Ci [γ -32P] ATP (10 μ l) の添加で反応を開始した。試料は 30℃ で 5 分間 インキュベートし、4 \times Laemmli 試料バッファの追加で停止する。タンパク質はトリス/グリシン SDS ゲル (Bio-Rad, Richmond CA から得て、予め調製しておいたもの) 上で分離し、クマシーブルーで着色し、乾燥し、ホスホイメーキング (phosphorimaging) プレート (K plates, Bio-Rad, Richmond CA) にさらし、ホスホイメージャー (phosphorimager) (Bio-Rad, Richmond CA) 上で読む。

【0139】

図 1 は、上述の分析結果を示し、PAK5 がミエリン塩基性タンパク質やヒストンのような一般的なキナーゼ基質リン酸化能を有することはこれから明らかである。

【0140】

実施例 4： PAK5 キナーゼ活性を調節する化合物を同定するための高処理能スクリーニング検定法

調節化合物を同定する高処理能スクリーニング分析は、MBP を塗付 96 穴 Flash Plates (登録商標) (NEN Life Science Products) を用いて行うことができる。キナーゼ反応バッファ (3 \times キナーゼ反応バッファ (KRB)) (次のものを含む：60 mM HEPES (pH 7.5)、30 mM 酢酸マグネシウム、0.15 mM ATP、3 mM DTT、0.03 mM オルトバナジン酸ナトリウム)、濃度 1 μ g/ml 以下の 0.25 μ Ci [γ -33P]-ATP (これはキナーゼと 1 時間動的測定が可能な濃度の個別の酵素調製液についての滴定で決定された。)) を各穴に加え、10 μ M の試験化合物存在下または不存在下に 30℃ で 1 時間 インキュベートする。全反応体積は 100 μ l である。インキュベーション後、反応混合液に通気し、各ウェルを 200 μ l PBS で 2 度すすぐ。放射性同位体で標識されたリン

酸塩の結合は、シンチレーション計測により行う (Packard Instrument Co. TopCount, 12検出器96穴マイクロプレートシンチレーション計測管および蛍光計測管 モデルB991200 (12-detector, 96-well microplate scintillation counter and luminescence counter, model B991200)) により決定される。10 μ Mでキナーゼ活性を>50パーセント阻害する化合物は、シンチレーション計測が>50%の減少することによって示される。特異性と選択性は、IC50 (または当業者に周知の他の比較用標準定量値) を決定する阻害化合物の滴定、および検定における他のキナーゼの置換により決定される。例えば、組換えPAK4キナーゼへの比較における相対的なキナーゼ活性阻害を抑制する活性の測定により、同様に発現、単離し、同様な条件下に検定することで、選択性データが得られる。

【0141】

実施例5: PAK5キナーゼ活性を調節する化合物を同定するための高処理能力クリーニング検定法

2. 5 mg/mlのDMISOストック溶液を蒸留水で1:10に希釈し、さらに水で1:10希釈を加えることにより試験化合物を調製する。1:100希釈溶液10 μ l (1%DMISO中25 μ g/ml)を96穴(ウェル)マイクロライト(Microlite)1プレート(Dynex)に調製し、検定を開始する時刻まで-20℃にプレートを保管した。

【0142】

試験化合物を含むウェルからのシグナルは、1%(v/v)DMISO Milli Q水10 μ lを含む無阻害ウェル、および、Milli Q水中に1%のDMISOと200 mM EDTA 10 μ lを含む100%阻害ウェルと比較する。50%の阻害ウェルは50%阻害度であることが既知の参照化合物を含んでいる1%(v/v)DMISO Milli Q水である。

【0143】

検定成分

(1) 組換えPak5キナーゼ(大腸菌または上述の真核細胞の中で発現された

もの。)または組換え酵素を発現する原核生物もしくは真核生物細胞、または天然ヒト細胞系から部分的に精製された酵素。

(2) [γ 33-P]-アデノシン山リン酸(3×KRB中)

(3) PVT SPA (シンチレーション近接度検定 (Scintillation Proximity Assay)) ビーズ (Amersham Pharmacia Biotech から購入) の表面に抗体タンパク質 A または他の適当な方法で連結したミエリン塩基性タンパク質

試験化合物 (室温に達するようにベンチに一夜放置しておいたもの) 10 μ l を含むマイクロライト 1 プレートに、ATP / ATP₃₃ 20 μ l を加え、その直後に 2 個のマルチドロップを用いて、酵素 30 μ l を直ちに添加する。プレートを積層し (トップのプレートからの蒸発を最小限にするため各スタック上に空のプレートを置く)、105 分間室温で放置する。抗ビーズ抗体および EDTA を含む「停止用溶液」の 150 μ l をマルチドロップを用いて添加する。プレートはプレートシーラーで密閉し、パースペクススクリーン (perspex screens) で包み、ベンチに一夜放置する。その後、プレートを 5 分間 2500 rpm 遠心分離し (Heraeus Megafuge 3, 0R)、トップカウント (Topcount) 機器で計測する (アイソトープ: P₃₃; 計測時間: 20 秒/ウェル)。阻害の閾値は、例えばシンチレーションシグナルの 60 % の阻害により設定する。阻害閾値に達する化合物を活性とし加点する。

【0144】

実施例 6: ノーザンブロット分析

ノーザンブロット分析を mRNA の発現を検討するために行った。配列番号 2 として示す PAK5 に基づいてセンスおよびアンチセンスプライマーを選択する。位置 318 ~ 1212 の断片を増幅しプローブとして用いた。

【0145】

Clontech から販売される多重ヒト組織ノーザンブロット (Human MTN #7760-1) をプローブとハイブリダイズした。プレハイブリダイゼーションを 42 °C で 4 時間実行した (5×SSC、1×デンハルト (Denhardt) 試薬、0.1% SDS、50%ホルムアミド、250 mg/ml の

サケ精液DNA中)。ハイブリダイゼーションは、標識したプローブ約 1.5×10^6 cpm/mlを加える以外は同じ溶液を用い42℃で一夜実行した。

【0146】

プローブは γ -32P-dCTPを用いRediprime DNA標識システム(Amersham Pharmacia)によって標識し、ニックカラム(Amersham Pharmacia)上で精製し、ハイブリダイゼーション液を加えた。フィルタは、0.2x SSC、0.1%のSDS中42℃で数回洗浄した。フィルタは、ホスホイメーキングプレート(K plates, Bio-Rad, Richmond CA)に露出され、ホスホイメージャー(Bio-Rad, Richmond CA)上で読み込んだ。

【0147】

上述の分析結果を図2Aに示す。PAK5プローブを使用したところ、単一の、約5kbのmRNAが脳(図2A、上段)に検出される。すべてのレーンで等量ロードすることにより、ヒトアクチンプローブ(図2A、下段)を備えたフィルタハイブリダイゼーションによって実証された。

【0148】

さらに正常なヒト脳中のPAK5の分布を調査するために、上記のノーザンブロット法の操作を、Clontech脳サブ領域ブロット(Clontech Human MTN Brain II, #7755-1, およびHuman MTN Brain IV, #7769-1)を使用して繰り返した。この分析の結果を図2Bに示す。PAK5は特に小脳、大脳皮質、後頭柱および前頭葉で強く発現されているが、脳の他のほとんどの領域で容易に検出された。

【0149】

実施例7：哺乳類細胞中でのPAK5の発現

1. 293細胞でのPAK5の発現

哺乳類細胞293(形質転換されたヒトの一次胚の腎臓細胞)中でPAK5を発現させるため、関連するPAK5コード配列を有するプラスミドをベクターpcDNA3.1 myc-his(Invitrogen)を使用して調製する。プラスミドは配列番号2のうちの1から2157塩基を含む。ベクターpcD

NA3.1 は、抗 myc 抗体を備えた組換えタンパク質を検出するため c-myc エピトープを含み、ニッケルキレート化合物クロマトグラフィーを用いた精製のため C 末端にポリヒスチジンを有し、安定した細胞導入体選択のためにネオマイシン耐性遺伝子を含む。PAK5 cDNA の増幅用の前方プライマーは、配列番号 2 に基づき当業者に利用可能な方法を使用することで選択され、NotI クローニング部位を導入するための 5' の 19 ヌクレオチド伸長部と PAK5 配列と一致する 22 ヌクレオチドを含む。逆方向プライマーは、配列番号 2 に基づき当業者に利用可能な方法を使用することで選択され、クローニング用に BamHI 制限部位を導入するための 5' の 8 ヌクレオチド伸長部と PAK5 配列の逆相補配列に対応する 17 ヌクレオチドを含む。PCR 条件はアニーリング温度として 55°C である。PCR 産物は、ゲル精製し、ベクターの NotI-BamHI 部位にクローニングする。

【 0150 】

DNA は、Qiagen クロマトグラフィーカラムを使用して精製し、SUPERFECT トランスフェクション・メディア (Qiagen) を使用して、293 個の細胞に細胞導入する。抗 His 抗 PAK5 ペプチド抗体をプローブとしてウエスタンブロットを用いて一過性細胞導入した細胞を導入後 24 時間後の発現について試験する。持続性細胞導入した細胞は、G418 で選択して増殖させる。組換えタンパク質の生産は抗 His 抗 Myc または抗 PAK5 ペプチド抗体をプローブに用いてウエスタンブロットによって細胞から検出される。

【 0151 】

PAK5 のキナーゼ領域欠損断片の発現については、ヌクレオチド 1～1347 を含むプラスミドが上述の手順に従って生成され、上記の手順が採られる。

【 0152 】

PAK5 のキナーゼドメイン含有断片の発現については、ヌクレオチド 1318～2157 を含むプラスミドが生成される。

【 0153 】

2. COS 細胞中での PAK5 の発現

COS7 細胞中で PAK5 を発現するために、配列番号 2 で付与される配列を

有するポリヌクレオチド分子をベクター p S e c T a g 2 A にクローニングする。ベクター p S e c T a g 2 A は、分泌用にネズミ I g K 鎖のリーダー配列、抗 m y c 抗体を備えた組換えタンパク質検出用の c - m y c エピトープ、ニッケルキレート化合物クロマトグラフィーを用いた精製のための C 末端ポリヒスチジン、および安定した安定した細胞導入体選択のためにゼオシン耐性遺伝子を含む。

【 0 1 5 4 】

P A K 5 c D N A の増幅用の前方プライマーは、配列番号 2 に基づき当業者に利用可能な方法を使用することで選択され、H i n d I I I クローニング部位を導入するための 5 ' の 1 9 ヌクレオチド伸長部と配列番号 2 中に付与される P A K 5 配列と一致する 2 2 ヌクレオチドを含む。逆方向プライマーは、配列番号 2 に基づき当業者に利用可能な方法を使用することで選択され、クローニング用に B a m H 1 制限部位を導入するための 5 ' の 8 ヌクレオチド伸長部と配列番号 2 中に付与される P A K 5 配列の逆相補配列に対応する 1 7 ヌクレオチドを含む。P C R 条件は初期変性ステップが 9 5 C で 5 分間であり、9 5 C 3 0 秒の変性、3 0 秒 5 8 C のアニーリング、3 0 秒 7 2 C の伸長、および 5 分間 7 2 C の伸長が 3 0 サイクルである。P C R 産物は、ゲル精製し、ベクターの p 3 - C I の X b a I および S a l I 部位に連結する。この構築で増幅および D N A 精製用の大腸菌を形質転換する。D N A は Q i a g e n クロマトグラフィーカラムで精製し、製造者の手順に従って、B R L のリポフェクタミン試薬を使用して、C O S 7 細胞に細胞導入する。導入後 4 8 および 7 2 時間に、媒体および細胞を組換えタンパク質発現について試験する。

【 0 1 5 5 】

C O S 細胞培養物から発現した P A K 5 は、細胞成長媒体を例えば約 1 0 m g タンパク質 / m l まで濃縮し、例えばクロマトグラフィーによってタンパク質を精製することにより精製することができる。精製された P A K 5 は、Y M - 1 0 薄膜を取り付けた A m i c o n コンセントレータ中 0 . 5 m g / m l まで濃縮し、- 8 0 ° C で保存する。

【 0 1 5 6 】

実施例 8 : 昆虫細胞中での P A K 5 の発現

バキュロウイルス (baculovirus) システム中で発現させるため、配列番号2として与えられた配列を有するポリヌクレオチド分子をPCRで増幅した。前方プライマーは、まずNot Iクローニング部位を導入するために加えられた5'の伸長部を含み、これに配列番号2中に付与されるヌクレオチド配列と一致する22ヌクレオチドが続く。逆方向プライマーは、まずBamH Iクローニング部位を導入するための5'の伸長部を含み、これに配列番号2中に付与されるヌクレオチド配列の逆相補配列に対応する17ヌクレオチドが続く。

【0157】

PCR産物はゲル精製し、Nde IとKpn Iで消化し、ベクターpAcHTL-A (Pharmingen, San Diego, CA)の対応する部位へクローニングする。pAcHTL発現ベクターは、オートグラフィカルホルニカ核多角体病ウイルス (AcMNPV: Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)の強い高角化プロモーター、および多重クローニング部位上流に6つのCHisタグを含む。リン酸化のためのタンパク質キナーゼ部位、および組換えタンパク質の切断のためのトロンビン部位は、多重クローニングに先行してさらに存在する。もちろん、pAcHTL-Aに代えて、pAc373、pVL941 およびpAcIM1のような他の多くのバキュロウイルスベクターを使用することができるであろう。PAK5ポリペプチドの発現のための他の適切なベクターも、ベクター構築物が適切な位置に転写、翻訳および移動のためのシグナル(例えばフレーム内AUG)および必要であればシグナルペプチドを含むのであれば、用いることができる。そのようなベクターはLuckow et al., Virology 170:31-39などに記載されている。

【0158】

ウイルスは、標準的なバキュロウイルス発現方法を使用して、成育し分離する。こうした方法はSummers et al. (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull

etin No. 1555(1987))に記載されている。

【0159】

好ましい実施形態では、PAK5遺伝子を含むpAcHLT-Aが“Baculogold”トランスフェクションキット(Pharmingen, San Diego, CA)をメーカーによって確立された方法で用いて、バキュロウイルスに導入される。個々のウイルスは、導入後24時間後に35Sメチオニンで放射性同位体で標識された導入細胞によりタンパク質生産を分析する。細胞導入細胞は、導入後48時間に回収し、標識タンパク質は、SDS-PAGEによって視覚化する。高い発現レベルを示すウイルスを分離して、スケールアップした発現に使用することができる。

【0160】

Sf9細胞中でのPAK5ポリペプチド発現のために、配列番号2で付与される配列を有するポリヌクレオチド分子を、バキュロウイルス発現の上記のプライマーおよび方法を用いたPCRによって増幅する。PAK5 cDNAをSf9昆虫での発現のためにベクターpAcHLT-A(Pharmingen)にクローニングする。バキュロウイルスの発現のための上記と同一のプライマーを使用いて内部NdeI部位を除去した後、挿入物をNotIとBamHIの部位にクローニングする。DNAをQiagenクロマトグラフィーカラムで精製し、Sf9細胞中で発現する。未精製のプラークからPAK5特異的抗体と反応する、予測した大きさの組換えタンパク質の存在を調べるため予備ウエスタンブロットを行った。結果をHiG5細胞中でさらに精製および発現最適化を行った後に確認する。

【0161】

実施例9：相互作用トラップ／2-ハイブリッドシステム

PAK5と相互作用するタンパク質を検定するために、相互作用トラップ／2-ハイブリッドライブラリースクリーニング法を用いることができる。この検定法は、Fields et al., Nature, 1989, 340, 245に記載されており、これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる。プロトコルはCurrent Protocols in Molecular

Biology 1999, John Wiley & Sons, NY and Ausubel, F. M. et al. 1992, Short protocols in molecular biology, Fourth edition, Greene and Wiley-Interscience, NYとして刊行されており、キットは、Clontech, Palo Alto, CA (Matchmaker Two-Hybrid System 3) から入手可能である。

【0162】

すべてまたは部分的にPAK5をコードするヌクレオチド配列と酵母転写因子GAL4 DNA結合ドメイン(DNA-BD)の融合は、標準的なサブクローニング技術を用いて、適切なプラスミド(つまりpGBKT7)に構築される。同様に、GAL4活性ドメイン(AD)融合ライブラリーは潜在的なPAK5結合性タンパク質のcDNAから別のプラスミド(つまりpGADT7)に構築される(cDNAライブラリーの形成に関するプロトコルに関しては、Sambrook et al., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY参照。これは参照によって本願に組込まれる。DNA-BD/PAK5融合構築物は、配列決定により確認され、自律的なリポーター遺伝子の活性化および細胞毒性(それらはいずれも2-ハイブリッドの分析の阻害要因となるであろう。)によって確認される。同様の制御はAD/ライブラリー融合構築物を用いて宿主細胞中での発現および転写活性の不活化を確認するためにも行われる。酵母細胞は、標準の方法(Ausubel, et al., 1992, Short protocols in molecular biology, Fourth edition, Greene and Wiley-Interscience, NY参照。これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる。)により、PAK5およびライブラリー融合プラスミドの両方で形質転換される(およそ 10^5 形質転換体/mg DNA)。In vivoでDNA-BD/PAK5をAD/ライブラリータンパク質を結合させると、特定の酵母プラス

ミドリポーター遺伝子（つまり *lacZ*、*HIS3*、*ADE2*、*LEU2*）の転写が行われる。酵母細胞を、リポーター遺伝子の発現スクリーニングのために最小栄養培地に植菌する。コロニーを、*Xgal*（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ヨード-ガラクトシド）添加培地中での成育に対する β -ガラクトシダーゼ活性について2重に検定する（ β -ガラクトシダーゼ活性についての過分析は *Breedon et al.*, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1985, 50, 643 に記載されており、これは参照によってその全体が本明細書に組み入れる）。陽性ADライブラリープラスミドを形質転換体から選別し、元の酵母に再導入するとともに、特定のPAK5/ライブラリータンパク質相互作用を確認するために無関係なDNA-BD融合タンパク質を含む他の株にも同様に導入する。挿入DNAは、GAL4-ADに融合したORFの存在を確認し、かつPAK5との同一性を決定するために配列決定される。

【0163】

実施例10：ゲル電気泳動を用いた可動性シフトDNA-結合性分析

ゲル電気泳動可動性シフト検定法は特定のタンパク質-DNA相互作用を迅速に検出できる。プロトコルは、*Sambrook et al.*, 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYおよび *Ausubel, F. M. et al.*, 1992, *Short protocols in molecular biology*, Fourth edition, Greene and Wiley-Interscience, NYのようなマニュアルで広く利用可能である（その各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れる。）。

【0164】

プローブDNA（<300 bp）は合成オリゴヌクレオチド、制限酵素切断断片、またはPCR断片から得られ、末端を³²Pで標識する。精製したPAK5アリコート（およそ15 μ g）または粗製PAK5抽出物（およそ15 ng）

を、放射性同位体で標識されたプローブDNA、非特異性の担体DNA（およそ $1\mu\text{g}$ ）、BSA（ $300\mu\text{g}/\text{ml}$ ）および10%（v/v）のグリセリン）を含むバッファー（つまりTAE、TBE、pH 8、8.5）10～15 μl 中で、少なくとも30分間一定温度（範囲22～37℃で）でインキュベートする。その後、反応混合物をポリアクリルアミドゲル上にロードし、タンパク質DNA複合体からの遊離プローブDNAがよく分離するまで、30～35mAで電気泳動を実行する。その後、ゲルを乾燥し、遊離DNAとタンパク質-DNA複合体に対応するバンドをオートラジオグラフィーで検出する。

【0165】

上記の本発明の好適実施形態のいくつかは下記に概要が記載され、以下の実施形態を含むがこれらに限定されない。当業者は、本発明の好適実施形態に対する多数の変更および修飾は本発明の精神から外れずに行い得ることを理解するであろう。このような変更はすべて発明の範囲以内にあることが意図される。また、ここに引用した各刊行物の全開示を、参照によって本明細書に組み込む。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia & Upjohn S.p.A.

<120> A new member of the PAK protein family, nucleic acids
and methods related to the same

<130> 00019

<140>

<141>

<150> US 09/439756

<151> 1999-11-15

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2511

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gagaccggga acatggcgct gggagcnctg tagcagctga gaaggggctg aggcaccgcc 60
gcttcgctga cagccggcca ccagatgttc atgcattcta gagaaagtgg aaaacttaga 120
agcctaatta atgactgtct tctggacctc tgagaccatg tttctagtgt tttccgtgga 180
atattatcag aaatacactg tggtgaaatg cttccacctc ttgctaaaat gaacactgag 240
gaaaaatgaa gaagactgac aagcaccagc gaaaagttgc agaatagaaa tagccacact 300
cctctggagt ctttaattca tccacagcca tcatataaag gttttggcat catgtttggg 360
aagaaaaaga aaaagattga aatatctggc ccgtccaact ttgaacacag ggttcatact 420

```

gggtttgatc cacaagagca gaagtttacc ggccttcccc agcagtggca cagcctgtta 480
gcagatacgg ccaacaggcc aaagcctatg gtggaccctt catgcatcac acccatccag 540
ctggctccta tgaagacaat cgttagagga aacaaacctt gcaaggaaac ctccatcaac 600
ggcctgctag aggattttga caacatctcg gtgactcgct ccaactccct aaggaaagaa 660
agccccacca cccagatca gggagcctcc agccacggtc caggccacgc ggaagaaaat 720
ggcttcatca ctttctccca gtattccagc gaatccgata ctactgctga ctacacgacc 780
gaaaagtaca gggagaagag tctctatgga gatgatctgg atccgtatta tagaggcagc 840
cacgcagcca agcaaaatgy gcacgtaatg aaaatgaagc acggggaggc ctactattct 900
gaggtgaagc ctttgaaatc cgattttgcc agattttctg ccgattatca ctcacatttg 960
gactcactga gcaaaccaag tgaatacagt gacctcaagt gggagtatca gagagcctcg 1020
agtagctccc ctctggatta ttcattccaa ttcacacctt ctagaactgc agggaccagc 1080
gggtgctcca aggagagcct ggcgtacagt gaaagtgaat ggggaccagc cctggatgac 1140
tatgacagga ggccaaagtc ttctgacctg aatcagacaa gccctcagcc caccatgcgg 1200
cagagggtcca ggtcaggctc gggactccag gaaccgatga tgccatttgg agcaagtgca 1260
tttaaaaccc atccccagg acactcctac aactcctaca cctaccctcg cttgtccgag 1320
cccacaatgt gcattccaaa ggtggattac gatcgagcac agatggctct cagccctcca 1380
ctgtcagggt ctgacaccta cccaggggc cctgccaac tacctcaaag tcaaagcaaa 1440
tcgggctatt cctcaagcag tcaccagtac cgtctgggt accacaaagc cacttgtac 1500
catcacccct ccctgcagag cagttcgag tacatctcca cggcttcta cctgagctcc 1560
ctcagcctct catccagcac ctaccgccg ccagctggg gtcctcctc cgaccagcag 1620
ccctccaggg tgtcccatga acagtttcgg gcgccctgc agctggtggt cagcccagga 1680
gacccaggg aatacttggc caactttatc aaaatcgggg aaggctcaac cggcatcgta 1740
tgcatcggca ccgagaaaca cacagggaaa caagttgcag tgaagaaaat ggacctccg 1800
aagcaacaga gacgagaact gcttttcaat gaggtcgtga tcatgcggga ttaccacat 1860
gacaatgtgg ttgacatgta cagcagctac cttgtcggcg atgagctctg ggtggtcag 1920
gagtttctag aagggtgtgc cttgacagac attgtgactc acaccagaat gaatgaagaa 1980
cagatagcta ctgtctgcct gtcagttctg agagctctct cctaccttca taaccaagga 2040
gtgattcaca gggacataaa aagtgactcc atcctcctga caagcgatgg ccggataaag 2100
ttgtctgatt ttggtttctg tgctcaagtt tccaaagagg tgccgaagag gaaatcattg 2160
gttggcactc cctactggat ggccctgag ctgatttcta ggctacctta tgggacagag 2220
gtggacatct ggtccctcgg gatcatggtg atagaaatga ttgatggcga gccccctac 2280
ttcaatgagc ctcccccca ggcgatgcgg aggatccggg acagtttacc tccaagagtg 2340

```

aaggacctac acaagggttc ttcagtgtc cggggattcc tagacttgat gttggtgagg 2400
 gagccctctc agagagcaac agcccaggaa ctctcggac atccattctt aaaactagca 2460
 ggtccaccgt cttgcacgt cccctcatg agacaatata ggcactactg a 2511

<210> 2

<211> 2157

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtttggga agaaaaagaa aaagattgaa atatctggcc cgtccaactt tgaacacagg 60
 gttcactactg ggtttgatcc acaagagcag aagtttaccg gccttcccca gcagtggcac 120
 agcctgttag cagatacggc caacaggcca aagcctatgg tggacccttc atgcatcaca 180
 cccatccagc tggctcctat gaagacaatc gttagaggaa acaaaccctg caaggaaacc 240
 tccatcaacg gcctgctaga ggattttgac aacatctcgg tgactcgctc caactcccta 300
 aggaaagaaa gcccacccac cccagatcag ggagcctcca gccacgggtcc aggccacgcg 360
 gaagaaaatg gcttcatcac cttctcccag tattccagcg aatccgatac tactgctgac 420
 tacacgaccg aaaagtacag ggagaagagt ctctatggag atgatctgga tccgtattat 480
 agaggcagcc acgcagccaa gcaaaatggg cacgtaatga aaatgaagca cggggagggc 540
 tactattctg aggtgaagcc ttgaaatcc gatthttgcca gattttctgc cgattatcac 600
 tcacatttgg actcactgag caaaccaagt gaatacagtg acctcaagtg ggagtatcag 660
 agagcctoga gtagctcccc tctggattat tcattccaat tcacaccttc tagaactgca 720
 gggaccagcg ggtgctccaa ggagagcctg gcgtacagtg aaagtgaatg gggaccacgc 780
 ctggatgact atgacaggag gccaaagtct tcgtacctga atcagacaag ccctcagccc 840
 accatgcggc agaggtccag gtcaggctcg ggactccagg aaccgatgat gccatttggga 900
 gcaagtgcac ttaaaaccca tcccaagga cactcctaca actcctacac ctaccctcgc 960
 ttgtccgagc ccacaatgtg cattccaaag gtggattacg atcgagcaca gatggctctc 1020
 agccctccac tgtcagggtc tgacacctac cccaggggcc ctgccaaact acctcaaagt 1080
 caaagcaaat cgggctattc ctcaagcagt caccagtacc cgtctgggta ccacaaagcc 1140
 accttgtacc atcaccctc cctgcagagc agttcgagc acatctccac ggcttccctac 1200
 ctgagctccc tcagcctctc atccagcacc taccgcgcgc ccagctgggg ctccctctcc 1260

```

gaccagcagc cctccagggt gtcccatgaa cagtttcggg cggccctgca gctggtggtc 1320
agcccaggag accccaggga atacttggcc aactttatca aaatcgggga aggctcaacc 1380
ggcatcgat gcatcggcac cgagaaacac acagggaaac aagttgcagt gaagaaaatg 1440
gacctccgga agcaacagag acgagaactg cttttcaatg aggtcgtgat catgcgggat 1500
taccaccatg acaatgtggt tgacatgtac agcagctacc ttgtcggcga tgagctctgg 1560
gtggtcatgg agtttctaga aggtggtgcc ttgacagaca ttgtgactca caccagaatg 1620
aatgaagaac agatagctac tgtctgcctg tcagttctga gagctctctc ctaccttcac 1680
aaccaaggag tgattcacag ggacataaaa agtgactcca tcctcctgac aagcgatggc 1740
cggataaagt tgtctgattt tggtttctgt gctcaagttt ccaaagaggt gccgaagagg 1800
aaatcattgg ttggcactcc ctactggatg gccctgagc tgatttctag gctaccttat 1860
gggacagagg tggacatctg gtccctcggg atcatggtga tagaaatgat tgatggcgag 1920
ccccctact tcaatgagcc tcccctccag gcgatgcgga ggatccggga cagtttacct 1980
ccaagagtga aggacctaca caaggtttct tcagtgtctc ggggattcct agacttgatg 2040
ttggtgaggg agccctctca gagagcaaca gcccaggaac tcctcggaca tccattctta 2100
aaactagcag gtccaccgtc ttgcatcgtc cccctcatga gacaatacac gcatcac 2157

```

<210> 3

<211> 719

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Phe Gly Lys Lys Lys Lys Lys Ile Glu Ile Ser Gly Pro Ser Asn

1

5

10

15

Phe Glu His Arg Val His Thr Gly Phe Asp Pro Gln Glu Gln Lys Phe

20

25

30

Thr Gly Leu Pro Gln Gln Trp His Ser Leu Leu Ala Asp Thr Ala Asn

35

40

45

Arg Pro Lys Pro Met Val Asp Pro Ser Cys Ile Thr Pro Ile Gln Leu
 50 55 60

Ala Pro Met Lys Thr Ile Val Arg Gly Asn Lys Pro Cys Lys Glu Thr
 65 70 75 80

Ser Ile Asn Gly Leu Leu Glu Asp Phe Asp Asn Ile Ser Val Thr Arg
 85 90 95

Ser Asn Ser Leu Arg Lys Glu Ser Pro Pro Thr Pro Asp Gln Gly Ala
 100 105 110

Ser Ser His Gly Pro Gly His Ala Glu Glu Asn Gly Phe Ile Thr Phe
 115 120 125

Ser Gln Tyr Ser Ser Glu Ser Asp Thr Thr Ala Asp Tyr Thr Thr Glu
 130 135 140

Lys Tyr Arg Glu Lys Ser Leu Tyr Gly Asp Asp Leu Asp Pro Tyr Tyr
 145 150 155 160

Arg Gly Ser His Ala Ala Lys Gln Asn Gly His Val Met Lys Met Lys
 165 170 175

His Gly Glu Ala Tyr Tyr Ser Glu Val Lys Pro Leu Lys Ser Asp Phe
 180 185 190

Ala Arg Phe Ser Ala Asp Tyr His Ser His Leu Asp Ser Leu Ser Lys
 195 200 205

Pro Ser Glu Tyr Ser Asp Leu Lys Trp Glu Tyr Gln Arg Ala Ser Ser
 210 215 220

Ser Ser Pro Leu Asp Tyr Ser Phe Gln Phe Thr Pro Ser Arg Thr Ala
 225 230 235 240

Gly Thr Ser Gly Cys Ser Lys Glu Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser Glu
 245 250 255

Trp Gly Pro Ser Leu Asp Asp Tyr Asp Arg Arg Pro Lys Ser Ser Tyr
 260 265 270

Leu Asn Gln Thr Ser Pro Gln Pro Thr Met Arg Gln Arg Ser Arg Ser
 275 280 285

Gly Ser Gly Leu Gln Glu Pro Met Met Pro Phe Gly Ala Ser Ala Phe
 290 295 300

Lys Thr His Pro Gln Gly His Ser Tyr Asn Ser Tyr Thr Tyr Pro Arg
 305 310 315 320

Leu Ser Glu Pro Thr Met Cys Ile Pro Lys Val Asp Tyr Asp Arg Ala
 325 330 335

Gln Met Val Leu Ser Pro Pro Leu Ser Gly Ser Asp Thr Tyr Pro Arg
 340 345 350

Gly Pro Ala Lys Leu Pro Gln Ser Gln Ser Lys Ser Gly Tyr Ser Ser
 355 360 365

Ser Ser His Gln Tyr Pro Ser Gly Tyr His Lys Ala Thr Leu Tyr His
 370 375 380

His Pro Ser Leu Gln Ser Ser Ser Gln Tyr Ile Ser Thr Ala Ser Tyr
 385 390 395 400

Leu Ser Ser Leu Ser Leu Ser Ser Ser Thr Tyr Pro Pro Pro Ser Trp
 405 410 415

Gly Ser Ser Ser Asp Gln Gln Pro Ser Arg Val Ser His Glu Gln Phe
 420 425 430

Arg Ala Ala Leu Gln Leu Val Val Ser Pro Gly Asp Pro Arg Glu Tyr
 435 440 445

Leu Ala Asn Phe Ile Lys Ile Gly Glu Gly Ser Thr Gly Ile Val Cys
 450 455 460

Ile Gly Thr Glu Lys His Thr Gly Lys Gln Val Ala Val Lys Lys Met
 465 470 475 480

Asp Leu Arg Lys Gln Gln Arg Arg Glu Leu Leu Phe Asn Glu Val Val
 485 490 495

Ile Met Arg Asp Tyr His His Asp Asn Val Val Asp Met Tyr Ser Ser
 500 505 510

Tyr Leu Val Gly Asp Glu Leu Trp Val Val Met Glu Phe Leu Glu Gly
 515 520 525

Gly Ala Leu Thr Asp Ile Val Thr His Thr Arg Met Asn Glu Glu Gln
 530 535 540

Ile Ala Thr Val Cys Leu Ser Val Leu Arg Ala Leu Ser Tyr Leu His
 545 550 555 560

Asn Gln Gly Val Ile His Arg Asp Ile Lys Ser Asp Ser Ile Leu Leu
 565 570 575

Thr Ser Asp Gly Arg Ile Lys Leu Ser Asp Phe Gly Phe Cys Ala Gln
 580 585 590

Val Ser Lys Glu Val Pro Lys Arg Lys Ser Leu Val Gly Thr Pro Tyr
 595 600 605

Trp Met Ala Pro Glu Leu Ile Ser Arg Leu Pro Tyr Gly Thr Glu Val
 610 615 620

Asp Ile Trp Ser Leu Gly Ile Met Val Ile Glu Met Ile Asp Gly Glu
 625 630 635 640

Pro Pro Tyr Phe Asn Glu Pro Pro Leu Gln Ala Met Arg Arg Ile Arg
 645 650 655

Asp Ser Leu Pro Pro Arg Val Lys Asp Leu His Lys Val Ser Ser Val
 660 665 670

Leu Arg Gly Phe Leu Asp Leu Met Leu Val Arg Glu Pro Ser Gln Arg
 675 680 685

Ala Thr Ala Gln Glu Leu Leu Gly His Pro Phe Leu Lys Leu Ala Gly
 690 695 700

Pro Pro Ser Cys Ile Val Pro Leu Met Arg Gln Tyr Arg His His
 705 710 715

<210> 4

<211> 1638

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

atgtcaaata acggcctaga cattcaagac aaacccccag cccctccgat gagaaatacc 60
agcactatga ttggagccgg cagcaaagat gctggaaccc taaaccatgg ttctaaacct 120
ctgcctccaa acccagagga gaagaaaaag aaggaccgat ttaccgatc cattttacct 180
ggagataaaa caataaaaa gaaagagaaa gagcggccag agatttctct cccttcagat 240
tttgaacaca caattcatgt cggttttgat gctgtcacag gggagttag oggaatgcca 300
gagcagtggg cccgcttgct tcagacatca aatatcacta agtcggagca gaagaaaaac 360
ccgcaggctg ttctggatgt gttggagttt tacaactcga agaagacatc caacagccag 420
aaatacatga gctttacaga taagtacagt gaggattaca attcttctaa tgccttgaat 480
gtgaaggctg tgtctgagac tctgacagt ccaccagttt cagaagatga ggatgatgat 540
gatgatgatg ctacccacc accagtgatt gctccacgcc cagagcacac aaaatctgta 600
tacacacggg ctgtgattga accacttcct gtcactccaa ctcgggacgt ggctacatct 660
cccatttcac ctactgaaaa taacaccact ccaccagatg ctttgaccct taatactgag 720
aagcagaaga agaagcctaa aatgtctgat gaggagatct tggagaaatt acgaagcata 780
gtgagtgtgg gcgatcctaa gaagaaatat acacggtttg agaagattgg acaagggtgct 840
tcaggcaccg tgtacacagc aatggatgtg gccacaggac aggagggtggc cattaagcag 900
atgaatcttc agcagcagcc caagaaagag ctgattatta atgagatcct ggtcatgagg 960
gaaaacaaga acccaaacat tgtgaattac ttggacagtt acctcgtggg agatgagctg 1020
tgggttggtt tggaatactt ggctggaggc tccttgacag atgtggtgac agaaacttgc 1080
atggatgaag gccaaattgc agctgtgtgc cgtgagtgtc tgcaggctct ggagtctttg 1140
cattcgaacc aggtcattca cagagacatc aagagtgaca atattctggt gggaatggat 1200
ggctctgtca agctaactga ctttggaatt tgtgcacaga taacccaga gcagagcaaa 1260
cggagcacca tggtaggaac ccatactgg atggcaccag aggttgtgac acgaaaggcc 1320
tatgggcca aggttgacat ctggtccctg ggcacatgg ccatcgaaat gattgaaggg 1380
gagcctccat acctcaatga aaaccctctg agagccttgt acctcattgc caccaatggg 1440
acccagaac ttcagaaccc agagaagctg tcagctatct tccgggactt tctgaaccgc 1500

```

tgtctcgaga tggatgtgga gaagagaggt tcagctaaag agctgctaca gcatcaattc 1560
 ctgaagattg ccaagcccct ctccagcctc actccactga ttgctgcage taaggaggca 1620
 acaaagaaca atcactaa 1638

<210> 5

<211> 1578

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atgtctgata acggagaact ggaagataag cctccagcac ctctgtgcg aatgagcagc 60
 accatcttta gcactggagg caaagaccct ttgtcagcca atcacagttt gaaacctttg 120
 cctctgttcc cagaagagaa aaagcccagc cataaaatca tctccatatt ctccaggcaca 180
 gagaaaaggaa gtaaaaagaa agaaaaggaa cggccagaaa tttctcctcc atctgatttt 240
 gagcacacca tccatgttgg ctttgatgct gttactggag aattcactgg catgccagaa 300
 cagtgggctc gattactaca gacctcaat atcaccaaac tagagcaaaa gaagaatcct 360
 caggctgtgc tggatgtcct aaagttctac gactccaaca cagtgaagca gaaatatctg 420
 agctttactc ctcttgagaa agatggcctt ccttctggaa cgccagcact gaatgccaag 480
 ggaacagaag caccgcgagt agtgacagag gaggaggatg atgatgaaga gactgctcct 540
 ccggttattg ccccgcgacc ggatcatacg aaatcaattt acacacggtc tgaattgac 600
 cctgttcctg caccagttgg tgattcacat gttgatggtg ctgccaagtc tttagacaaa 660
 cagaaaaaga agcctaagat gacagatgaa gagattatgg agaaattaag aactatcgtg 720
 agcatagggtg accctaagaa aaaatataca agatatgaaa aaattggaca aggggcttct 780
 ggtacagttt tctactgctac tgacgttgca ctgggacagg aggttgctat caaacaatt 840
 aatttacaga aacagccaaa gaaggaactg atcattaacg agattctggt gatgaaagaa 900
 ttgaaaaatc ccaacatcgt taactttttg gacagttacc tggtaggaga tgaattgttt 960
 gtggatcatgg aataccttgc tggggggtca ctactgatg tggtaacaga aacagcttgc 1020
 atggatgaag cacagattgc tgctgtatgc agagagtgtt tacaggcatt ggagttttta 1080
 catgctaatac aagtgatcca cagagacatc aaaagtgaca atgtactttt gggaatggaa 1140
 ggatctgtta agctcactga ctttggtttc tgtgccaga tcaccctga gcagagcaaa 1200
 cgcagtacca tggtcggaac gccatactgg atggcaccag aggtggttac acggaaagct 1260

```

tatggcccta aagtcgacat atggtctctg ggtatcatgg ctattgagat ggtagaagga 1320
gagcctccat acctcaatga aaatcccttg agggccttgt acctaatagc aactaatgga 1380
accccagaac ttcagaatcc agagaaactt tccccaatat ttcgggattt cttaaatega 1440
tgtttgaaa tggatgtgga aaaaaggggt tcagccaaag aattattaca gcaccccttc 1500
ctgaaactgg ccaaaccgtt atctagcttg acaccactga tcatggcagc taaagaagca 1560
atgaagagta accgttaa                                     1578

```

<210> 6

<211> 1635

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

atgtctgacg gtctggataa tgaagagaaa cccccggctc ctccactgag gatgaatagt 60
aacaaccggg attcttcagc actcaaccac agctccaaac cacttcccat ggcccctgaa 120
gagaagaata agaaagccag gcttcgctct atcttccag gaggagggga taaaaccaat 180
aagaagaagg agaaagagcg ccagagatc tctcttctt cagactttga gcatacgatt 240
catgtggggg ttgatgcagt caccggggaa ttcactggaa ttccagagca atgggcacga 300
ttactccaaa cttccaacat aacaaaattg gaacagaaga agaaccaca agctgttcta 360
gatgtttcta aattctatga ttccaaagaa acagtcaaca accagaaata catgagcttt 420
acatcaggag ataaaagtgc acatggatac atagcagccc atccttcgag tacaaaaaca 480
gcactctgagc ctccattggc cctcctgtg tctgaagaag aagatgaaga ggaagaagaa 540
gaagaagatg aaaatgagcc accaccagtt atcgcaccaa gaccagagca tacaaaatca 600
atctatactc gttctgtggg tgaatccatt gcttcaccag cagtaccaa taaagaggtc 660
acaccaccct ctgctgaaaa tgccaattcc agtactttgt acaggaacac agatcggcaa 720
agaaaaaaat ccaagatgac agatgaggag atcttagaga agctaagaag cattgtgagt 780
gttggggacc caaagaaaaa atacacaaga tttgaaaaaa ttggtaagg ggcacaggt 840
actgtttata cagcactaga cattgcaaca ggacaagagg tggccataaa gcagatgaac 900
cttcaacagc aacccaagaa ggaattaatt attaatgaaa ttctgggtcat gagggaaaat 960
aagaacccta atattgttaa ttatttagat agctacttgg tgggtgatga actatgggta 1020
gtcatggaat acttggtgg tggctctctg actgatgtgg tcacagagac ctgtatggat 1080

```

```

gaaggacaga tagcagctgt ctgcagagag tgcctgcaag ctttggaattt cctgcactca 1140
aaccaggtga tccatagaga tataaagagt gacaatatc ttctcgggat ggatggctct 1200
gttaaattga ctgacttttg gttctgtgcc cagatcactc ctgagcaaag taaacgaagc 1260
actatggtgg gaaccccata ttggatggca cctgaggtgg tgactcgaaa agcttatggt 1320
ccgaaagttg atatctggtc tcttgaatt atggcaattg aaatgggtga aggtgaaccc 1380
ccttacctta atgaaaatcc actcagggca ttgtatctga tagccactaa tggaaactcca 1440
gagctccaga atcctgagag actgtcagct gtattccgtg actttttaaa tcgctgtctt 1500
gagatggatg tggataggcg aggatctgcc aaggagcttt tgcagcatcc atttttaaaa 1560
ttagccaagc ctctctccag cctgactcct ctgattatcg ctgcaaagga agcaattaag 1620
aacagcagcc gctaa 1635

```

<210> 7

<211> 1776

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

atgtttggga agaggaagaa gcgggtggag atctccgcgc cgtccaactt cgagcaccgc 60
gtgcacacgg gcttcgacca gcacgagcag aagttcacgg ggctgccccg ccagtggcag 120
agcctgatcg aggagtcggc tcgccggccc aagccctcgc tcgacccccg ctgcatcacc 180
tccatccagc ccggggcccc caagaccatc gtgcggggca gcaaagggtc caaagatggg 240
gccctcacgc tgctgctgga cgagtttgag aacatgtcgg tgacacgctc caactccctg 300
cggagagaca gcccgccgcc gcccgcccgt gcccgccagg aaaatgggat gccagaggag 360
ccggccacca cggccagagg gggcccaggg aaggcaggca gccgaggccg gttcgcgggt 420
cacagcgagg caggtggcgg cagtggtgac aggcgacggg cggggccaga gaagaggccc 480
aagtcttcca gggagggtc aggggggtccc caggagtcct cccgggacaa acgccccctc 540
tccgggcctg atgtcggcac ccccagcct gctggtctgg ccagtggggc gaaactggca 600
gctggccggc cctttaacac ctacccgagg gctgacacgg accacccatc ccgggggtgc 660
cagggggagc ctcacgacgt ggcccctaac gggccatcag cggggggcct ggccatcccc 720
cagtcctcct cctcctcctc ccggcctccc acccgagccc gaggtgcccc cagccctgga 780
gtgctgggac cccacgcctc agagccccag ctggccccctc cagcctgcac ccccgccgcc 840

```

```

cctgctgttc ctgggcccc tgccccccgc tcaccacagc gggagccaca gcgagtatcc 900
catgagcagt tccgggctgc cctgcagctg gtggtggacc caggcgaccc ccgctccctac 960
ctggacaact tcatcaagat tggcgagggc tccacgggca tcgtgtgcat cgcacccgtg 1020
cgcagctcgg gcaagctggg ggccgtcaag aagatggacc tgcgcaagca gcagaggcgc 1080
gagctgctct tcaacgaggt ggtaatcatg agggactacc agcacgagaa tgtggtggag 1140
atgtacaaca gctacctggg gggggacgag ctctgggtgg tcatggagtt cctggaagga 1200
ggcgccctca ccgacatcgt caccacaccc aggatgaacg aggagcagat cgcagccgtg 1260
tgccttgcat tgctgcaggc cctgtcgggt ctccacgccc agggcgatcat ccaccgggac 1320
atcaagagcg actcgatcct gctgacccat gatggcaggg tgaagctgtc agactttggg 1380
ttctgcgccc aggtgagcaa ggaagtgcgc cgaaggaaat cgctggtcgg cagccctac 1440
tggatggccc cagagctcat ctccgcctt ccctacgggc cagaggtaga catctgggtc 1500
ctggggataa tggtgattga gatggtggac ggagagcccc cctacttcaa cgagccaccc 1560
ctcaaagcca tgaagatgat tcgggacaac ctgccacccc gactgaagaa cctgcacaag 1620
gtgtcgccat cctgaaggg ctccctggac cgctgctgg tgcgagaccc tgcccagcgg 1680
gccacggcag ccgagctgct gaagcaccca ttcttgcca aggcagggcc gcctgccagc 1740
atcgtgcccc tcatgcgcca gaaccgcacc agatga 1776

```

<210> 8

<211> 581

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

gagaccggga acatggcgct gggagcncgt tagcagctga gaaggggctg aggcaccgcc 60
gcttcgctga cagccggcca ccagatgttc atgcattcta gagaaagtgg aaaacttaga 120
agcctaatta atgactgtct tctggacctc tgagaccatg tttctagtgt tttccgtgga 180
atattatcag aaatacactg tggtgaaatg ctccacctc ttgctaaaat gaacactgag 240
gaaaaatgaa gaagactgac aagcaccagc gaaaagttgc agaatagaaa tagccacact 300
cctctggagt cttaattca tccacagcca tcatataaag gttttggcat catgtttggg 360
aagaaaaaga aaaagattga aatatctggc ccgtccaact ttgaacacag ggttcatact 420
gggtttgatc cacaagagca gaagtttacc ggccttcccc agcagtggca cagcctgtta 480

```


gcagatacgg ccaacaggcc aaagcctatg gtggaccctt catgcatcac acccatccag 540
ctggctccta tgaagacatc gttagaggaa acaaaccctg c 581

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

gcacatcatggt tgggaagaaa 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

asctcwgkgk ccatccarta 20

<210> 11

<211> 1846

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

gcatcatggtt tgggaagaaa aagaaaaaga ttgaaatata tggcccggtcc aacttttgaac 60
acagggttca tactgggttt gatccacaag agcagaagtt taccggcctt cccagcagc 120
ggcacagcct gttagcagat acggccaaca ggccaaagcc tatggtggac ccttcacatgca 180
tcacacccat ccagctggct cctatgaaga caatcgttag aggaaacaaa ccctgcaagg 240
aaacctccat caacggcctg ctagaggatt ttgacaacat ctcggtgact cgctccaact 300
ccctaaggaa agaaagccca cccaccccag atcagggagc ctccagccac ggtccaggcc 360
acgcggaaga aaatggcttc atcaccttct cccagtattc cagcgaatcc gatactactg 420
ctgactacac gaccgaaaag tacagggaga agagtctcta tggagatgat ctggatccgt 480
attatagagg cagccacgca gccaaagcaa atgggcacgt aatgaaaatg aagcacgggg 540
aggcctacta ttctgaggtg aagcctttga aatccgattt tgccagattt tctgccgatt 600
atcactcaca tttggactca ctgagcaaac caagtgaata cagtgcctc aagtgggagt 660
atcagagagc ctcgagtagc tcccctctgg attattcatt ccaattcaca ccttctagaa 720
ctgcagggac cagcgggtgc tccaaggaga gcctggcgta cagtgaaagt gaatggggac 780
ccagcctgga tgactatgac aggagggcaa agtcttcgta cctgaatcag acaagccctc 840
agcccaccat gcggcagagg tccaggtcag gctcgggact ccaggaaccg atgatgcat 900
ttggagcaag tgcatttaaa acccatcccc aaggacactc ctacaactcc tacacctacc 960
ctcgcttgtc cgagcccaca atgtgcatte caaagggtga ttacgatcga gcacagatgg 1020
tctcagccc tccactgtca gggcttgaca cctaccccag gggccctgcc aaactacctc 1080
aaagtcaaag caaatcgggc tattcctcaa gcagtcacca gtacccgtct gggtaccaca 1140
aagccacctt gtaccatcac cctccctgc agagcagttc gcagtacatc tccacggcct 1200
cctacctgag ctccctcagc ctctcatcca gcacctacc gccgcccage tggggctcct 1260
cctccgacca gcagccctcc aggggtgtcc atgaacagtt tcggggggcc ctgcagctgg 1320
tggtcagccc aggagacccc agggaaatac tggccaactt tatcaaaatc ggggaaggct 1380
caaccggcat cgtatgcac gccaccgaga aacacacagg gaaacaagtt gcagtgaaga 1440
aaatggacct ccggaagcaa cagagacgag aactgctttt caatgaggtc gtgatcatgc 1500
gggattacca ccatgacaat gtggttgaca tgtacagcag ctaccttgtc ggcgatgagc 1560
tctgggtggt catggagttt ctagaagggt gtgccttgac agacattgtg actcacacca 1620
gaatgaatga agaacagata gctactgtct gcctgtcagt tctgagagct ctctcctacc 1680
ttcataacca aggagtgatt cacagggaca taaaaagtga ctccatctc ctgacaagcg 1740
atggccggat aaagttgtct gattttggtt tctgtgtcga agtttccaaa gaggtgccga 1800

```

agaggaaatc attggttggc actccctact ggatggcccc tgagct

1846

<210> 12

<211> 417

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ataaagttgt ctgatttttg tttctgtgct caagtttcca aagaggtgcc gaagaggaaa 60
tcattggttg gcactcccta ctggatggcc cctgaggtga tttctaggct accttatggg 120
acagaggtgg acatctggtc cctcgggatc atggtgatag aaatgattga tggcgagccc 180
ccctacttca atgagcctcc cctccaggcg atgcggagga tccgggacag ttacctcca 240
agagtgaagg acctacacaa ggttttcttca gtgctccggg gattcctaga cttgatgttg 300
gtgagggagc cctctcagag agcaacagcc caggaactcc tcggacatcc attcttaaaa 360
ctagcaggtc caccgtcttg catcgtcccc ctcatgagac aatacaggca tcaactga 417

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

gagaccggga acatggcgct

20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

tcagtgatgc ctgtattgtc tc

22

【図面の簡単な説明】

【図1A】

293繊維芽細胞溶解物から免疫精製されたPAK5に対するキナーゼ測定の結果であり、該キナーゼが全般的に基質をリン酸化できることを示す図である。

【図1B】

293繊維芽細胞溶解物から免疫精製されたPAK5に対するキナーゼ測定の結果であり、該キナーゼが全般的な基質をリン酸化できることを示す図である。

【図2A】

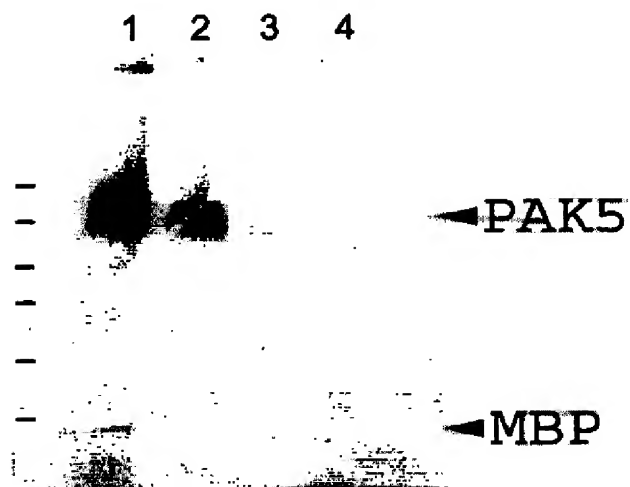
正常なヒト組織中のPak5 mRNAの分布を示す多組織のノーザンブロットを示す図である。

【図2B】

正常なヒト組織中のPak5 mRNAの分布を示す多組織のノーザンブロットを示す図である。

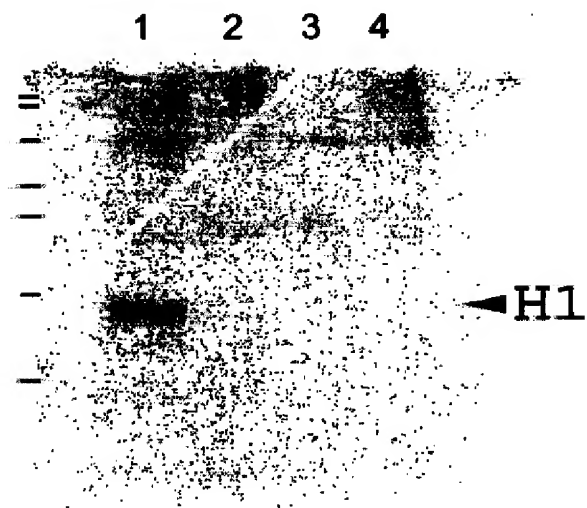
【図1A】

Figure 1A



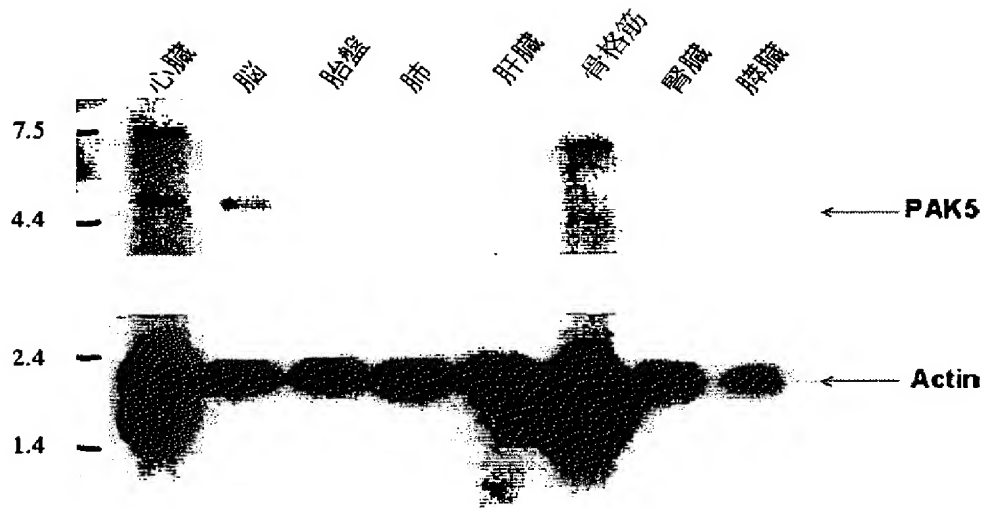
【図1B】

Figure 1B



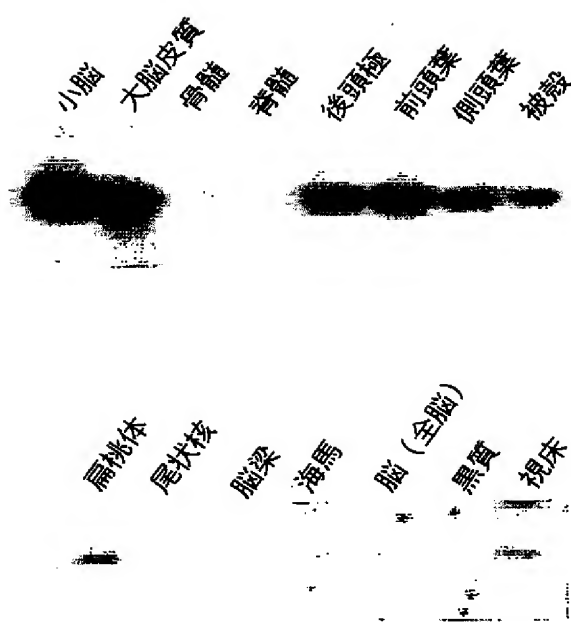
【 図 2 A 】

Figure 2A



【 図 2 B 】

Figure 2B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/10736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N9/12 C12N1/20 C12Q1/68	C12N15/54 A61K38/45 A61K39/395 A61K121/00 C12N1/14 C12N1/14 C12Q1/48
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EP0-Internal, WPI Data, STRAND, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T. NAGASE ET AL., : "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro" DNA RESEARCH, vol. 6, no. 5, 29 October 1999 (1999-10-29), pages 337-345, XP000865804 the whole document & DATABASE EMBL ID/AC=AB033090 (Submitted 04.10.1999, created 11.11.1999) human mRNA for KIAA1264 protein	1-9, 13-15, 25-32
X	WO 99 53036 A (SUGEN INC ;WHYTE DAVID (US); PLOWMAN GREGORY (US); MARTINEZ RICARD) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document	1-3,5-7, 9-27, 29-47 4,8,28
Y		
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 April 2001		03.05.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Julia, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/10736

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ABO A ET AL: "PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 17, no. 22, November 1998 (1998-11), pages 6527-6540, XP002147782 ISSN: 0261-4189 the whole document	1-3, 5-7, 9-27, 29-47
A	BAGRODIA S ET AL: "Pak to the future" TRENDS IN CELL BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD, XX, vol. 9, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 350-355, XP000925936 ISSN: 0962-8924 the whole document	1-3, 5-7, 9-27, 29-47
Y		4, 8, 28
P, X	DATABASE SWISS-PROT: SWALL 'Online! ID=PAK5_HUMAN; AC=Q9P286 (Submitted 03-2000) , 1 October 2000 (2000-10-01) NM WATANABE ET AL., : "PAK5, A NOVEL GROUP II PAK FAMILY KINASE THAT IS PREDOMINANTLY EXPRESSED IN BRAIN" XP002164869 abstract & DATABASE EMBL ID/AC=A3040812 (Submitted 29.03.200, created 26.04.2000)	1-6, 25, 27-32
P, X	WO 00 58473 A (CURAGEN CORP.; LEACH MARTIN (US); SHIMKETS RICHARD A (US)) 5 October 2000 (2000-10-05) the whole document and SEQ ID No.: 3017	1-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/10736**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 39 (complete) and 40, 43, 45-47 (partially, as far as they embrace methods carried out in vivo) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 48-50
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 48-50

Present claims 48-50 relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being identified by the methods of claims 40, 43 and 45 respectively.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application does not provide support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search for the claimed subject matter is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search for the claimed subject matter impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/10736

Patent document/ cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9953036	A	21-10-1999	AU 3642499 A EP 1073723 A	01-11-1999 07-02-2001
WO 0058473	A	05-10-2000	AU 3774500 A	16-10-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P	9/00	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
	25/00	37/06	4 C 0 8 4
	35/00	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 5
	37/06	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/40	1/21	
C 1 2 N	1/19	9/10	
	1/21	C 1 2 Q 1/48	Z
	5/10	1/68	A
	9/10	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q	1/48	33/50	Z
	1/68	33/53	D
G 0 1 N	33/15	C 1 2 P 21/08	
	33/50	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	33/53	5/00	A
// C 1 2 P	21/08	A 6 1 K 37/54	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ガルバニ, アルツウロ
 イタリア国、イー20015・パラビアゴ、ビ
 ア・タツエツソ・7

F ターム(参考) 2G045 AA35 CB01 CB21 DA13 DA36
FB01 FB02 FB03
4B024 AA11 BA10 CA04 DA02 DA06
DA12 EA02 EA04 FA02 GA11
HA12 HA15
4B050 CC03 DD11 LL03
4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ42 QQ52
QQ95 QR07 QR55 QR59 QR62
QR77 QR80 QS24 QS25 QS28
QS34
4B064 AG27 AG31 CA10 CA20 CC24
DA13
4B065 AA26X AA80X AA90X AA91X
AA93Y AB01 AC14 CA31
CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01
BA08 BA22 CA18 CA53 DC22
NA14 ZA02 ZA36 ZB08 ZB26
ZC19 ZC20
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 CC31
DD62 EE01
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 DA89
EA50 FA72